

Aus der Universitäts-Kinderklinik in Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. F. Linneweh

Erprobung mikrobiologischer Hemmteste zur Erkennung der Galaktosämie und der Leucinose (Ahornsirupkrankheit)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Heide Groß
aus Bunzlau

Marburg 1967

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Aus der Universitäts-Kinderklinik in Marburg

Direktor: Prof. Dr. med. F. Linneweh

Erprobung mikrobiologischer Hemmteste zur Erkennung der Galaktosämie und der Leucinose (Ahornsirupkrankheit)



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Heide Groß

aus Bunzlau

Marburg 1967

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 28. 11. 1967

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. med. R. Siegert

Referent: Prof. Dr. med. H. Bickel

Correferent: Prof. Dr. med. R. Siegert



Meinen Eltern gewidmet

Inhalt

	Seite
Einleitung	1
E r s t e r T e i l	
<u>Ein mikrobiologischer Hemmtest für die Galaktosämie .</u>	2
I. Die Galaktosämie, Pathogenese und Klinik	2
II. Die biochemische Diagnose der Galaktosämie. Die wichtigsten bisher bekannten Methoden	3
III. Die mikrobiologische Methode nach ROBERT GUTHRIE.	7
1. Prinzip	7
2. Praktische Ausführung	7
A. Vorbereitung zum Versuch	7
a. Herstellung der Kontrollblutplättchen	7
b. Gewinnung der Blutproben von Neugeborenen.	8
c. Herstellung des Mediums	9
d. Züchtung des B. coli W 3101	10
B. Der Versuch	12
IV. Kritische Prüfung der Methode	14
1. Der Wachstumshof direkt um das Blutplättchen .	14
2. Beeinflussung der Hemmhofgröße durch die Bak- terienmenge	15
3. Spezifität und Genauigkeit der Methode	17
A. Einfluß von Antibiotika	17
B. Einfluß von anderen physiologischen Sub- stanzen im Blut	19

	Seite
C. Reproduzierbarkeit und Meßgenauigkeit	21
D. Vergleichende Galaktosebestimmung: Im GUTHRIE- Test und als Differenz von Gesamtreduktion und "wahrer Glukose"	25
4. Technische Fehlermöglichkeiten	27
V. Resultate	29
1. Routinemäßige Untersuchung von Neugeborenen	29
2. Galaktosebelastungen bei Neugeborenen	32
3. Galaktosebelastungen bei zwei Patienten	33
4. Galaktosebelastungen bei Heterozygoten und nor- malen Vergleichspersonen	35
VI. Diskussion	40

Z w e i t e r T e i l

<u>Ein mikrobiologischer Hemmtest für die Leucinose</u>	
<u>(Ahornsirupkrankheit)</u>	44
I. Die Leucinose, Pathogenese und Klinik	44
II. Die biochemische Diagnose der Leucinose. Die wich- tigsten bisher bekannten Methoden	45
III. Die mikrobiologische Methode nach ROBERT GUTHRIE ..	48
1. Prinzip	48
2. Praktische Ausführung	48
A. Vorbereitung zum Versuch	48
a. Herstellung der Kontrollblutplättchen	48
b. Gewinnung der Blutproben von Neugeborenen ..	49
c. Herstellung des Mediums	50

	Seite
d. Züchtung des <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051	
und Herstellung der fertigen Sporenauf-	
schwemmung für den Versuch	51
B. Der Versuch	51
IV. Kritische Prüfung der Methode	53
1. Beeinflussung des Wachstumshofes durch die Hemm-	
stoffmenge	53
2. Spezifität und Genauigkeit der Methode	54
A. Einfluß von Antibiotika	54
B. Einfluß anderer physiologischer Substanzen	
im Blut	55
C. Reproduzierbarkeit und Meßgenauigkeit	55
D. Vergleichende Leucinbestimmung: Mikrobiolo-	
gisch im GUTHRIE-Test und säulenchromatogra-	
phisch nach MOORE, SPACKMAN und STEIN	60
3. Technische Fehlermöglichkeiten	62
V. Resultate	64
1. Routinemäßige Untersuchung von Neugeborenen ...	64
2. Untersuchung eines Patienten mit der "forme	
fruste" der Leucinose	66
3. Leucinbelastungen bei Heterozygoten und norma-	
len Vergleichspersonen	69
VI. Diskussion	72
Praktische Schlußfolgerung aus der Erprobung beider	
Teste	75
Zusammenfassung	76
Literaturverzeichnis	78

Einleitung

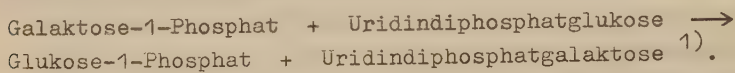
Die Galaktosämie und die Leucinose (Ahornsirupkrankheit) sind rezessiv vererbte Stoffwechselkrankheiten, die ohne rechtzeitig einsetzende Therapie zum Tode oder zu Schäden am Gehirn und an anderen Organen führen. Die Schädigung wird hervorgerufen durch abnorme Erhöhung eines bestimmten Metaboliten im Blut als Folge von dessen Anhäufung vor einem Enzymblock. Da man heute den genauen Sitz des Enzymdefektes kennt, kann eine wirksame Therapie durch Korrektur der Nahrung (d.h. durch teilweise oder völlige Entfernung des betreffenden Metaboliten aus der Nahrung) vorgenommen und so eine weitere störungsfreie Entwicklung des Patienten erzielt werden. Entscheidend für die Prognose ist jedoch das frühzeitige Einsetzen einer solchen Diät, noch bevor der angehäuften Metabolit irreversible Läsionen gesetzt hat. Es ergibt sich daher die Frage nach einem einfachen diagnostischen Test, der, um genügend sicher zu sein, die Anhäufung dieses Metaboliten primär im Blut nachweist. Ein solcher Test ist für die Phenylketonurie, einer anderen angeborenen Stoffwechselanomalie, die ebenfalls auf einem rezessiv vererbten Enzymdefekt beruht, in Form eines mikrobiologischen Hemmtestes von ROBERT GUTHRIE (19) entwickelt worden. Seine Einfachheit, Wirtschaftlichkeit und methodische Zuverlässigkeit erlauben seine erfolgreiche Anwendung zur routinemäßigen Durchtestung eines Teils der Neugeborenen von Hessen, Hannover und Bremen. Zwei weitere auf ähnlichen Prinzipien beruhende GUTHRIE-Teste für die Galaktosämie und für die Leucinose (20,21) sollen in dieser Arbeit untersucht und kritisch besprochen werden. Es sei vorausgeschickt, daß diese Hemmteste semiquantitativer Natur sind, wodurch ihr Wert als Suchteste zum Nachweis erheblicher Stoffwechselabweichungen von der Norm aber nicht eingeschränkt wird.

ERSTER TEIL

Ein mikrobiologischer Hemmtest für die Galaktosämie

I. Die Galaktosämie, Pathogenese und Klinik

Die Galaktosämie ist pathogenetisch gekennzeichnet durch das Fehlen oder die verminderte Aktivität eines Enzyms, der Galaktose-1-Phosphaturidyltransferase (32). Dieses Enzym katalysiert folgende Reaktion:



Infolge des Enzymdefektes kommt es nach Milchfütterung zu einer abnormen Erhöhung von Galaktose und Gal-1-P im Blut, Gewebe und Urin. Von SCHWARZ und Mitarb. wurde eine Anhäufung des letzteren in den Erythrozyten galaktosämischer Patienten sowohl in vivo als auch in vitro demonstriert (49). Ein hemmender Effekt des Gal-1-P auf eine Anzahl von Enzymen wie Phosphoglucomutase, G-6-P-phosphatase und G-6-P-dehydrogenase wird von verschiedenen Autoren (18,53,35) beschrieben und als Grund für die Toxizität des Metaboliten angenommen.

1) Im folgenden werden die Abkürzungen verwendet:

Gal-1-P	Galaktose-1-Phosphat
G-1-P	Glukose-1-Phosphat
UDP-Gal	Uridindiphosphatgalaktose
UDPG	Uridindiphosphatglukose
DPN	Diphospho-Pyridin-Nukleotid
TPN	Triphospho-Pyridin-Nukleotid

Die Häufigkeit der homozygoten Patienten beträgt nach Schätzungen von HANSEN und Mitarb. (28) auf den Britischen Inseln 1:70 000, die Häufigkeit der Heterozygoten 1:134.

Klinisch wird die Krankheit in ihrer schweren akuten Form in den ersten Tagen nach der Geburt offenbar durch Nahrungsverweigerung, Erbrechen, Gewichtsverlust, Dehydratation, Vergrößerung von Leber und Milz und Gelbsucht. Linsenkatarakte folgen gewöhnlich erst nach einigen Wochen. Im Urin findet sich eine Galaktosurie, Proteinurie sowie eine abnorme Aminoacidurie (6). Interkurrente Infekte oder Leberinsuffizienz führen zum Tode. Die akute Verlaufsform ist durch die schwere Ernährungsstörung und das Leberversagen, die chronische durch die allmähliche Entwicklung von Lebercirrhose, Linsenkatarakt und Schwachsinn charakterisiert.

II. Die biochemische Diagnose der Galaktosämie.. Die wichtigsten bisher bekannten Methoden

Die biochemische Diagnose der Galaktosämie beruht auf dem Nachweis der Anhäufung von Galaktose oder des Enzymdefektes im Blut bzw. im Urin. Neben der größeren Sicherheit einer Methode, die den angehäuften Stoff primär im Blut nachweist, haben alle Tests, die mit Kapillarblut arbeiten, gegenüber Urinuntersuchungen den Vorteil, daß beim Säugling Kapillarblut wesentlich leichter zu gewinnen ist als Urin.

Zwei Gruppen von Nachweismethoden lassen sich unterscheiden: Die erste Gruppe zeigt eine Abhängigkeit von dem jeweiligen Galaktosespiegel des Bluts (d.h. von der Milchfütterung). Dazu gehören der zu beschreibende mikrobiologische Hemmtest für Galaktosämie und alle Tests, bei denen die Galaktose als Differenz von Gesamtreduktion und "wahrer Glukose" bestimmt wird. Die zweite Gruppe ist unabhängig vom Galaktoseblutspiegel. Hierher gehören die

Teste, die direkt auf der Demonstration der An- oder Abwesenheit der Galaktose-1-Phosphaturidyltransferase in den Erythrozyten beruhen, wobei in vitro der Vorgang der Milchfütterung nachgeahmt wird. Sie lassen sich zum großen Teil schon am Nabelschnurblut durchführen und erlauben auch dann eine Diagnose, wenn das Kind milchfrei ernährt wird oder wenig Milch aufnimmt.

Der mikrobiologische Hemmtest von GUTHRIE macht es möglich, daß eine Person täglich 200 Blutproben und mehr auf vermehrte Galaktose untersuchen kann, obwohl das Ergebnis erst nach Bebrütung über Nacht abgelesen wird. Alle anderen bisher bekannten Tests zum Nachweis der Galaktosämie sind zeitraubender und vor allem auf frische Blutproben, d.h. auf Blut in flüssigem Zustand, angewiesen. Der große Vorteil des GUTHRIE-Hemmtestes besteht darin, daß er mit nur einem Tropfen Blut, auf ein Stück Filterpapier getropft und getrocknet, arbeitet. Daraus ergibt sich die bequeme Handhabung der Blutproben im Hinblick auf den Transport. Die Blutproben können auf der Filterpapierkarte in einen Briefumschlag gesteckt und mit der Post zur zentralen Untersuchungsstelle geschickt werden. Auch die Lagerung wird vereinfacht, da die Proben auf wenig Platz bei Zimmertemperatur unverändert aufbewahrt werden können.

Es folgt eine kurze Übersicht über die bisher bekannten Methoden zum Nachweis der Galaktosämie.

1. Galaktosebestimmung als Differenz von Gesamtreduktion und "wahrer Glukose"

Die Gesamtreduktion kann nach HAGEDORN-JENSEN (27) mit Kaliumferrizyanid als Oxydationsmittel bestimmt werden oder nach anderen Methoden, die auf der Reduktion von Kupfersalzen beruhen (3,17,52,54). Die spezifische Erfassung der Glukose geschieht enzymatisch mit Glukoseoxydase (46) oder mit Hexokinase und Glukose-6-Phosphatdehydrogenase als Zwischenferment. Letztere Methode wurde von BARTHELMAI und

CZOK (2) so vereinfacht, daß die Zeit für eine Bestimmung nur wenige Minuten beträgt, wohingegen der HAGEDORN-JENSEN-Test relativ umständlich und zeitraubend ist und außerdem eine unspezifische Reaktion durch die "Restreduktion" liefert, d.h. außer Glukose und Galaktose noch andere reduzierende Substanzen im Blut miterfaßt.

2. Direkter Nachweis des Enzymdefektes

- a. ANDERSON (1) beschrieb 1958 einen spezifisch enzymatischen Test, dessen Prinzip im Nachweis der Gal-1-P-uridyltransferase im Hämolysat menschlicher Erythrozyten beruht. Das verdächtige Hämolysat wird mit Gal-1-P und UDPG inkubiert. Die zurückgebliebene UDPG-Menge wird enzymatisch durch die UDPG-dehydrogenase bestimmt, die UDPG zu UDP-Glukuronsäure in Gegenwart von DPN oxydiert. Die Menge des entstandenen DPNH ist proportional der UDPG-Menge, die nach der Inkubation zurückbleibt. Der Test verlangt 2 - 8 ml Venenblut und ist sehr zeitraubend.
- b. Ein Test direkt am Nabelschnurblut wurde von SCHWARZ und Mitarb. 1958 (49) vorgeschlagen. Die Methode basiert auf der Entdeckung, daß Inkubation von Erythrozyten der Patienten mit Galaktose zu einer Anhäufung von Gal-1-P in diesen Zellen führt (48). Die Erythrozyten werden mit Galaktose inkubiert. Nach Hydrolyse des Gal-1-P wird der freie Zucker chromatographisch identifiziert. Dieser Test verlangt mindestens 2 ml Blut und braucht 2 - 3 Tage zur Ausführung.
- c. Ein vereinfachter Test mit nur 0,2 ml Blutverbrauch, der in wenigen Stunden durchgeführt werden kann, wurde von SCHWARZ 1960 beschrieben (50). Der Test lehnt an einen manometrischen Versuch zur Bestimmung der Uridyltransferaseaktivität von KIRKMAN und BYNUM (34) an und beruht auf der Tatsache, daß normales Bluthämolysat aktiv Gal-1-P veratmet im Gegensatz zum Hämolysat der Patienten. Eine Volumenverminderung, angezeigt durch das Sinken

einer Flüssigkeitssäule von Kaliumhydroxyd, findet nur in einem Reaktionsröhrchen statt, in dem normales Blut mit Gal-1-P inkubiert wurde, nicht dagegen in einem Röhrchen, welches Patientenblut enthält. Der Test ist sehr einfach auszuführen und ermöglicht es, innerhalb weniger Stunden eine Diagnose zu stellen.

- d. BEUTLER und Mitarb. beschrieben 1964 einen einfachen Screeningtest (5), der ebenfalls auf dem Nachweis der Gal-1-P-uridyltransferase im Blut beruht. 0,1 ml Blut werden zu einem Reaktionsgemisch gegeben, das sehr stabil ist und im wesentlichen aus Gal-1-P, UDPG, TPN und Methylenblau besteht. Bei Vorhandensein von Gal-1-P-uridyltransferase wird Gal-1-P und UDPG in G-1-P und UDP-Galaktose umgewandelt. G-1-P wird durch die normalerweise im Blut vorhandene Phosphoglucomutase zu G-6-P umgewandelt. G-6-P wird durch G-6-P-dehydrogenase oxidiert, um TPN zu reduzieren. TPNH reduziert Methylenblau zu seiner Leukoform. Die Zeit der Entfärbung dient als Maß für die Uridyltransferaseaktivität. Sie wird unspezifisch durch Lagerungs- und Transportdauer beeinflusst.
- e. Eine weitere einfache Methode, die allerdings die Anschaffung einer geeigneten Apparatur erfordert, ist der Mikrodiffusionstest nach LONDON und Mitarb. (39). Hierbei wird die Radioaktivität des $C^{14}O_2$ gemessen, das bei Inkubation des Blutes mit Gal-1- C^{14} gebildet wird. Seine Entstehung ist abhängig von dem Vorhandensein der Gal-1-P-uridyltransferase.

III. Die mikrobiologische Methode nach ROBERT GUTHRIE

1. Prinzip

Das Prinzip dieses Testes besteht in der Hemmung des Wachstums einer uridyltransferasefreien Mutante von *Escherichia coli* durch Galaktose auf einem bestimmten Nährboden.

Zur routinemäßigen Testung von Neugeborenen wird durch Hackenstich ein Tropfen Blut gewonnen und auf ein genormtes Filterpapier getropft. Aus dem Blutfleck wird mit einem gewöhnlichen Locher ein Plättchen ausgestanzt und auf den mit *Escherichia coli* W-3101 inokulierten Nährboden gelegt. Die um diese Plättchen nach Bebrütung entstandenen Hemmhöfe werden mit den Hemmhöfen von Kontrollblutplättchen verglichen, die jeweils mit Blut verschiedener Galaktosekonzentration getränkt und auf den gleichen Nährboden gelegt wurden.

2. Praktische Ausführung

Die von GUTHRIE angegebene Vorschrift (21) zur Ausführung des Versuchs wurde aus Gründen der Einfachheit den Möglichkeiten des hiesigen Labors angepaßt und leicht modifiziert.

A. Vorbereitung zum Versuch

a. Herstellung der Kontrollblutplättchen

Gewöhnliches Zitratblut im Verhältnis Vollblut : Zitratlösung (5 %-ige Natriumzitratlösung) wie 9 : 1 wird verwendet. Der Gehalt des Blutes an Galaktose wird mit 0 mg% angenommen. Diese Annahme stützt sich auf eine Untersuchung von DONNELL und Mitarb. (14) 1963, die zur Durchführung von Galaktosebelastungstesten bei 21 Kontrollpersonen den Nüchternwert der Galaktose im Blut bestimmten. Die Plasma-Galaktose, die als Differenz von Gesamtreduktion und wahrer

Glukose erfaßt wurde, lag bei 4 Personen bei 1-3mg%, die übrigen Personen zeigten keine Galaktose im Plasma. Gal-1-P in den Erythrozyten, das enzymatisch durch den Verbrauch von UDPG bestimmt wurde, fehlte bei allen Kontrollpersonen.

Man stellt 6, 10, 30, 50 und 100 mg%-ige Blut-Galaktoselösungen her. Die Ergebnisse von Zitratblut und Heparinblut decken sich bei dieser semiquantitativen Methode, so daß die etwas größere Verdünnung des Zitratblutes unberücksichtigt bleiben kann. Die Lösungen werden mit einer Pipette so auf ein Filterpapier einheitlicher Dicke (Schleicher und Schüll Nr. 2992) getropft, daß mit möglichst einem Tropfen ein Blutfleck von etwa 10 mm Durchmesser entsteht und auch die Rückseite gleichmäßig durchtränkt ist. Aus jedem dieser Flecken wird mit einem gewöhnlichen Papierlocher ein Plättchen ausgestanzt. Die Plättchen gleicher Konzentration werden in entsprechend gezeichneten Plastikbeuteln bei 2 - 4 °C im Exsikkator aufbewahrt. Sie halten sich unverändert bis zu 3 Monaten.

b. Gewinnung der Blutproben von Neugeborenen ¹⁾

Mit einer scharfen Lanzette sticht man in die Hacke des Neugeborenen. Ein großer Tropfen Blut wird auf die vorgezeichneten Kreise der Testkarten aus Filterpapier getropft. Auch die Rückseite des Papiers muß durchtränkt sein. Aus der Testkarte wird ein kleines Stück, das den Blutfleck enthält, ausgeschnitten und mit Bleistift gezeichnet.

1) Da in Marburg ein seit April 1964 offiziell gestartetes Phenylketonurietestprogramm abläuft, konnten in dieser Arbeit Blutproben der Testkarten verwendet werden, die täglich zur Untersuchung auf Phenylketonurie aus Hessen, Hannover und Bremen eintrafen und jeweils 3 Blutflecken auf vorgedruckten Kreisen enthielten.

Zum Versuch werden diese Blutflecken wie auch die Kontrollblutplättchen für etwa 15 Stunden mit Eisessigdampf behandelt. Dadurch koaguliert der Blutfarbstoff, wodurch seine Diffusion in den Agar verhindert wird. Außerdem wird Gal-1-P in freie Galaktose umgewandelt. In eine gut verschließbare Glasbox (etwa 42 cm x 28 cm x 28 cm) wird eine größere Petrischale mit Eisessig offen hineingestellt. Die ausgeschnittenen Kärtchen mit dem Blutfleck werden nebeneinander auf den Boden der Box gelegt. Die Kontrollplättchen werden auf entsprechend gezeichnete Objektträger in die gleiche Box gelegt.

c. Herstellung des Mediums

Bestandteile:

1.	NH_4Cl	12,5 g
2.	NH_4NO_3	2,5 g
3.	Na_2SO_4	5,0 g
4.	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250 mg
5.	CaCl_2	50 mg
6.	K_2HPO_4	24 g
7.	KH_2PO_4	8 g
8.	Glyzerin	40%-ige Lösung

Spurenelementlösung:

$(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$	40,8 mg
H_3BO_3	57,0 mg
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	935,0 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	393,0 mg
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	72,0 mg
ZnCl_2	4,16mg

Bereitung:

1. Die Bestandteile der Spurenelementlösung werden abgewogen und in 1 Liter destilliertem Wasser gelöst. Diese Lösung kann bei Zimmertemperatur auf-

bewahrt werden und braucht für die folgenden Versuche nicht mehr erneuert zu werden.

2. Die Bestandteile des Mediums von 1. bis 5. werden abgewogen. Nachdem 2,5 ml der Spurenelementlösung dazupipettiert wurden, wird mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Dann werden jeweils 500 ml dieser Lösung in zwei 750 ccm fassende Erlenmeyerkolben abgefüllt und diese mit einem Stück Aluminiumfolie verschlossen.
3. Die angegebenen Mengen von KH_2PO_4 und K_2HPO_4 werden in 200 ml destilliertem Wasser gelöst und in einen 300 ccm fassenden Erlenmeyerkolben gegeben, und dieser wird mit Aluminiumfolie verschlossen.
4. 200 ml einer 40%-igen Glyzerinlösung werden hergestellt und ebenfalls in einen 300 ccm fassenden Erlenmeyerkolben gegeben.
5. 1,8 g Agar (Agar-Agar, Firma Merck, Stuttgart) werden in eine 300 ccm fassende Nährbodenflasche gegeben, dazu werden 100 ml destilliertes Wasser gefüllt.
6. Alle oben genannten Stoffe werden 15 Minuten bei einem Druck von 1,5 - 2 atü autoklaviert.
7. Nach Abkühlen können die Flaschen bei Zimmertemperatur bis zu 3 Wochen aufbewahrt werden.

d. Züchtung des B. coli W 3101

1. Vermehrung einer Ampulle mit getrockneten Bakterien

Eine Ampulle mit getrockneten Bakterien (E. coli, strain W5; Lederberg strain 3101 von Dr. Kenneth Paigen vom Roswell Park Memorial Institute, USA, Buffalo 3, N.Y.) wird geöffnet, 1 bis 2 ml 0,9%-iger Kochsalzlösung hineinpipettiert und von dieser Suspension ein Ausstrich auf Blutagar gemacht. Die nach Bebrütung über Nacht entstandene Kultur wird auf ihre Reinheit geprüft. Die reine Kultur

wird auf Schrägagar ausgestrichen, nach Bebrütung über Nacht eine dichte Suspension hergestellt und davon jeweils 1 - 2 ml in die gewünschte Anzahl von Ampullen pipettiert. Diese werden dann lyophilisiert (gefriergetrocknet) und zugeschmolzen.

2. Routinemäßige Weiterzüchtung der Bakterien und Herstellung der Bakterienaufschwemmung für den Versuch

Eine Ampulle wird geöffnet, 1 - 2 ml 0,9%-ige Kochsalzlösung hinzugegeben und auf einen Tryptikase-Soy-Agar-Nährboden ausgestrichen. Auf diesem Spezialnährboden hält sich die Kultur bis zu 6 Wochen bei 2 - 4 °C. Der Nährboden wurde fertig aus dem Marburger Hygiene-Institut bezogen. Die Haltbarkeitsdauer auf einem Standard-Fertignährboden wurde noch nicht geprüft.

Zur Ausführung des Versuches wird am Tage vorher diese Kultur auf Schrägagar überimpft und über Nacht in den Brutschrank gestellt. Der Schrägagar wurde in Pulverform als Fertignährboden von der Firma Merck bezogen und selbst hergestellt. Es ist ein einfacher Standard-Nährboden mit folgender Zusammensetzung:

Spezialpepton	15,6 g/Liter
Hefeextrakt	2,8 g/Liter
NaCl	5,6 g/Liter
D-Glukose	1,0 g/Liter
Agar-Agar	10,0 g/Liter

Bereitung:

3,5 g des Fertignährbodens werden zu 100 ml destilliertem Wasser gegeben und in einer 300 ccm fassenden Nährbodenflasche 15 Minuten bei einem Druck von 1,5 - 2 atü autoklaviert. Etwa jeweils 10 ml des heißen Nährbodens werden in sterile Re-

agenzgläser gegeben und diese mit sterilem Wattepfropf verschlossen. Man läßt sie dann in leichter Schräglage erkalten. Zu einem Versuch werden zwei Schrägagargläser mit *E. coli* beimpft. Nach etwa 15-stündiger Bebrütung bei 37 °C wird von dieser Kultur eine Aufschwemmung hergestellt und diese in ein steriles Reagenzglas gefüllt. 4 ml einer Suspension von einer optischen Dichte von 0,82 oder einer Lichtdurchlässigkeit von 15 % werden zu einer Testplatte benötigt. Die optische Dichte wird im gleichen Reagenzglas im Eppendorf-Photometer bei einem Filter von 546 m μ gemessen, wofür ein Küvettenhalter für runde Meßgefäße benutzt wird. Die Reagenzgläser brauchen nicht geeicht zu sein. Es ist aber zweckmäßig, sowohl für den Leerwert als auch für den Meßwert immer die gleichen Reagenzgläser zu benutzen.

B. Der Versuch

1. Der Agar wird im kochenden Wasserbad zum Schmelzen gebracht und dann für 15 Minuten in ein Wasserbad von 50 - 55 °C gestellt.
2. 80 ml Medium (aus den Bestandteilen 1.-5., siehe Seite 9) werden in einen 300 ccm fassenden sterilen Erlenmeyerkolben gegeben, dazu werden je 10 ml Kaliumphosphat-Pufferlösung und Glycerinlösung steril pipettiert. Diese Lösung wird ebenfalls für 15 Minuten in ein Wasserbad von 50 - 55 °C gebracht.
3. Dann wird das Medium zu dem Agar in die Agarflasche gegeben. Anschließend wird beides zur besseren Vermischung wieder in die Mediumflasche zurückgeschüttet. 50 ml davon werden verworfen, so daß die Menge des Agar-Mediums nur 150 ccm beträgt, statt der ursprünglich angegebenen 200 ccm. Durch die geringere Schichtdicke des Agar-Mediums wird die Wachstumsintensität der Bakterien erhöht, so daß die Hemm-

höfe besser heraustreten.

4. 4 ml der fertigen Bakteriensuspension werden steril hinzupipettiert. Das Ganze wird kräftig geschüttelt.
5. Ein flaches Plastiktablett (25 cm x 17 cm) wird mit 96%-igem Alkohol ausgewaschen. Darunter wird eine entsprechende Schablone gelegt, auf der die Zahlen von 1 - 65 in regelmäßiger Anordnung vorgezeichnet sind. Nun wird das inokulierte Agar-Medium vorsichtig hineingegeben, so daß keine Bläschen entstehen und die Flüssigkeit überall gleichmäßig hoch den Boden der Schale bedeckt.
6. Ist der Agar erstarrt, wird mit einem gewöhnlichen Locher aus den gesammelten und mit Eisessigdampf behandelten Blutflecken der Neugeborenen je ein Blutplättchen ausgestanzt und mit einer Pinzette auf den Agar gelegt, entsprechend den Zahlen der Schablone. Zum Schluß werden die Kontrollplättchen auf die unterste Reihe gelegt in folgender Reihenfolge:
6mg%; 6mg%; 10mg%; 10mg%; 30mg%; 30mg%; 50mg%; 100mg%
7. Die Platte wird mit einem passenden Plastikdeckel verschlossen und umgekehrt, mit dem Deckel nach unten, für etwa 15 Stunden in den Brutschrank bei 37 °C gestellt.
8. Am nächsten Tag werden die Hemmhöfe der Kontrollplättchen mit denen der Blutplättchen unbekannter Konzentration verglichen.

IV. Kritische Prüfung der Methode

1. Der Wachstumshof direkt um das Blutplättchen

Schon bei den ersten Versuchen fiel eine schmale Wachstumszone direkt um die Blutplättchen auf, die es bei den Kontrollplättchen unter 6 mg% unmöglich machte, einen Hemmhof abzulesen. Diese Wachstumshöfe fehlten bei den Plättchen, die nur mit wäßriger Galaktoselösung getränkt waren. GUTHRIE weist darauf hin (25), daß möglicherweise Glukose oder bestimmte Aminosäuren im Blut die E. coli Mutante daran hindern, auf Galaktose zu reagieren. (z.B. durch Hemmung der Galaktokinasebildung). Zur Klärung dieses Phänomens wurden jeweils 100 mg%-ige wäßrige Galaktose- und Glukoselösungen hergestellt, sowie jeweils 20 mg%-ige wäßrige Lösungen von folgenden Aminosäuren: Alanin, Arginin, Asparagin, Asparaginsäure, Cystin, Glutamin, Glutaminsäure, Glycin, Leucin, Isoleucin, Lysin, Methionin, Ornithin, Prolin, Serin, Taurin, Threonin und Valin. Von diesen Lösungen wurde jeweils ein Tropfen auf Filterpapier getropft und aus diesen Flecken Plättchen ausgestanzt. Mehrere Galaktoseplättchen wurden dann auf eine gewöhnliche Testplatte gelegt und auf jedes Galaktoseplättchen ein Glukose- oder Aminosäureplättchen. Nach Bebrütung trat nur bei den übereinanderliegenden Galaktose- und Methioninplättchen ein sehr schwacher Wachstumshof auf, so daß diese Aminosäure kaum allein für die Wachstumszone um die Blutplättchen verantwortlich gemacht werden kann. Bei Glukose und bei allen anderen Aminosäuren war ein klarer Hemmhof zu sehen.

Eine genaue Aussage über die Substanz bzw. die Substanzen im Blut, die den Wachstumshof um die Blutplättchen verursachen, ließ sich nach dieser Untersuchung nicht machen.

In einer späteren Mitteilung weist GUTHRIE darauf hin, daß wahrscheinlich eine Kombination verschiedener Amino-

säuren für diese Wachstumszone verantwortlich ist (26).

2. Beeinflussung der Hemmhofgröße durch die Bakterienmenge

Die Größe der Hemmhöfe ist abhängig von der für den jeweiligen Versuch benutzten Bakterienmenge.

GUTHRIE schlug zur Ausführung eines Versuches 4 ml einer Bakterienaufschwemmung von einer Lichtdurchlässigkeit von 10 % (= optische Dichte 1) bei einem Filter von 550 m in 200 ml Agar-Medium vor (24). Er wies auch auf die Möglichkeit hin, für den Versuch eine Bakterienaufschwemmung zu verwenden, deren Dichte nur mit bloßem Auge abgeschätzt wird (24). Diese Möglichkeit erlaubt jedoch keine Aussage über die Reproduzierbarkeit der Hemmhofgröße auf verschiedenen Testplatten.

Die folgenden Tabellen geben die Abhängigkeit der Hemmhofgröße der Kontrollplättchen von der benutzten Bakterienmenge wieder.

Tabelle 1: Hemmhofgröße bei Benutzung von 4 ml einer Bakterienaufschwemmung von 10 % Lichtdurchlässigkeit in 200 ml Agar-Medium (Filter: 546 m μ)

Zahl der Versuche	Galaktosekonzentration der Kontrollplättchen (mg%) 1)	Durchmesser der Hemmhöfe (mm)	
		Streubreite	Mittelwert
15	10 2)	15 - 16	15,8
15	30	18 - 19	18,6
15	100	21,5 - 23	22,6

- 1) "Galaktosekonzentration der Kontrollplättchen" bezeichnet im folgenden die Galaktosekonzentration des Blutes, mit dem die Plättchen getränkt sind.
- 2) Kontrollplättchen mit Galaktosekonzentration von 6 mg% und 50 mg% wurden erst in den folgenden Versuchen eingeführt.

Tabelle 2: Hemmhofgröße bei Benutzung von 2 ml einer Bakterienaufschwemmung von 10 % Lichtdurchlässigkeit in 200 ml Agar-Medium (Filter: 546 m μ)

Zahl der Versuche	Galaktosekonzentration der Kontrollplättchen (mg%)	Durchmesser der Hemmhöfe (mm)	
		Streubreite	Mittelwert
8	6	19,5 - 21	20,3
10	10	18,5 - 20	19,6
10	30	22 - 23,5	22,5
10	50	24 - 26	25,2
10	100	25 - 27,5	26,1

Tabelle 3: Hemmhofgröße bei Benutzung von 2 ml einer Bakterienaufschwemmung von 10 % Lichtdurchlässigkeit in 150 ml Agar-Medium (Filter: 546 m μ)

Zahl der Versuche	Galaktosekonzentration der Kontrollplättchen (mg%)	Durchmesser der Hemmhöfe (mm)	
		Streubreite	Mittelwert
28	6	16 - 19	17,5
30	10	17 - 20	18,9
30	30	19,5 - 22	21,6
30	50	21,5 - 24,5	22,9
30	100	24 - 26,5	24,5

Tabelle 4: Hemmhofgröße bei Benutzung von 4 ml einer Bakterienaufschwemmung von 15 % Lichtdurchlässigkeit in 150 ml Agar-Medium (Filter: 546 m μ)

Zahl der Versuche	Galaktosekonzentration der Kontrollplättchen (mg%)	Durchmesser der Hemmhöfe (mm)	
		Streubreite	Mittelwert
50	6	15,5 - 18,5	16,7
50	10	16 - 18,5	17,3
50	30	18 - 21	19,4
50	50	20 - 23	21,3
50	100	22 - 24,5	23,2

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß mit zunehmender Bakterienmenge die Hemmhöfe kleiner werden und eine schärfere Begrenzung aufweisen. Bei zu großen Hemmhöfen lassen sich besonders die unteren Kontrollwerte wie 6 mg% und 10 mg% nur schlecht genau ausmessen, ebenso verschwindet jedoch auch bei zu kleinen Höfen der Kontrast zwischen Hemmhof und bewachsenem Gebiet, da dann auch im Bereich des Hemmhofes ein leichtes Wachstum auftritt.

Von allen vier oben erprobten Möglichkeiten erschien die letzte optimal in bezug auf Größe der Hemmhöfe, Schärfe ihrer Begrenzung und Kontrast zwischen Hemmhof und bewachsenem Gebiet und wurde daher zur Ausführung des größten Teils der folgenden Versuche angewendet.

3. Spezifität und Genauigkeit der Methode

A. Einfluß von Antibiotika

Um den Einfluß von Antibiotika zu erfassen, wurde zunächst eine Resistenzbestimmung für E. coli 3101 (W 5) mit dem gewöhnlichen Plättchentest durchgeführt. Es er-

gaben sich dabei folgende Resultate:

empfindlich	schwach empfindlich	resistent
Sulfonamide	Colistin	Oxacillin
Tetracycline	Nogram	Erythromycin
Chloramphenicol	Streptomycin	Bacitracin
Kanamycin		Novobiocin
Neomycin		Oleandomycin
Nitrofurantoin		Penicillin

Daraufhin wurden Blutproben von Patienten mit folgender Antibiotikabehandlung im Galaktosämietest untersucht:

Antibiotikum	Zahl der Patienten	Zahl der Hemmhöfe
Colistin	9	0
Tetracyclin	5	1 (<6mg%)
Reverin	7	0
Terramycin	5	0
Chloramphenicol	7	0
Gantrisin	10	0

Außerdem wurden 56 Blutproben der Testkarten, die täglich zur Untersuchung auf Phenylketonurie kamen und die ganz allgemein den Hinweis "Antibiotikabehandlung" trugen, untersucht. Davon zeigten 3 im Galaktosämietest einen Hemmhof unter 6 mg%.

Schlußfolgerung: Die Blutproben der unter Antibiotikabehandlung stehenden Patienten zeigten normales Verhalten im GUTHRIE-Test. Zu einer sicheren Aussage im Einzelfall

ist allerdings eine gleichzeitige genaue Galaktosebestimmung im Blut mit einer anderen Methode notwendig.

B. Einfluß von anderen physiologischen Substanzen im Blut

Jeweils 100 mg%-ige wäßrige Lösungen von Galaktose, Glukose, Fruktose, Mannose, Ribose, Xylose und Arabinose wurden hergestellt, sowie 20 mg%-ige wäßrige Lösungen von folgenden Aminosäuren: Alanin, Arginin, Asparagin, Asparaginsäure, Cystin, Glutamin, Glutaminsäure, Glycin, Leucin, Isoleucin, Lysin, Methionin, Ornithin, Prolin, Taurin, Threonin und Valin. Von diesen Lösungen wurde jeweils ein Tropfen auf Filterpapier getropft. Aus den getrockneten Flecken wurden Plättchen ausgestanzt und auf den mit *E. coli* beimpften Nährboden gelegt. Dabei traten nach Bebrütung über Nacht bei Galaktose ein Hemmhof von 26 mm, bei Valin ein Hemmhof von 24 mm und bei Glycin ein schwacher Hemmhof von 14 mm Durchmesser auf. Alle anderen Substanzen verursachten keine Hemmung. Es wurden dann 3, 4, 6, 8 und 16 mg%-ige Blut-Valin- und Blut-Glycinlösungen nach dem gleichen Prinzip hergestellt, das auch zur Herstellung der Leucinkontrollplättchen diente (siehe Seite 48). Die aus diesen Lösungen hergestellten Blutplättchen ergaben im Galaktosämietest folgende Resultate:

Valinkonzentration des Blutes, mit dem die Plättchen getränkt sind (mg%)	Durchmesser der Hemmhöfe (mm)
3	Ø 1)
4	13
6	14
8	17
16	19,5

1) Ø = kein meßbarer Hemmhof

Glycinkonzentration des Blutes, mit dem die Plättchen getränkt sind (mg%)	Durchmesser der Hemmhöfe (mm)
3	Ø
4	Ø
6	Ø
8	Ø
16	13

Galaktosekontrollplättchen auf der gleichen Testplatte ergaben folgende Hemmhöfe:

Galaktosekonzentration der Kontrollplättchen (mg%)	Durchmesser der Hemmhöfe (mm)
6	17
6	17
10	17,5
10	18
30	20,5
30	19,5
50	21,5
100	23,5

Zusammenfassend ergibt sich somit die Tatsache, daß ein Valin-Blutspiegel von 4 - 6 mg% im Galaktosämietest einen Hemmhof macht, der unter dem kleinsten mit Galaktose-Kontrollplättchen darstellbaren Hemmhof von 6 mg% liegt, bei 16 mg% aber einen Wert erreicht, der einem Galaktosespiegel von 30 mg% entspricht. Im Fall des

Glycins entsteht erst bei einer Konzentration von 16 mg% ein schwacher Hemmhof, der unter dem kleinsten mit Galaktose-Kontrollplättchen darstellbaren Hemmhof liegt. Der Test ist also nicht spezifisch.

C. Reproduzierbarkeit und Meßgenauigkeit

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist ein Maß für die Meßgenauigkeit der Methode.

Es wurde die Reproduzierbarkeit der Hemmhöfe von Kontrollplättchen gleicher Konzentration und von Blutproben gleicher Konzentration sowohl auf gleichen als auch auf verschiedenen Testplatten geprüft.

a. Tabelle 5: Gleiche Kontrollplättchen auf gleichen Testplatten

Galaktosekonzentration der Kontroll- plättchen (mg%)	Durchmesser der Hemmhöfe (mm)		Zahl der Beobach- tungen pro Test- platte	Stan- dardab- weichung
	Streubreite	Mittelwert		
Testplatte Nr. 1				
6	17 - 17,5	17,2	5	0,25
10	16,5- 17,5	17,2	5	0,40
30	18,5- 19,5	19,1	5	0,49
50	20,5- 21,5	20,9	5	0,49
100	23 - 24	23,4	5	0,37
Testplatte Nr. 2				
6	18,5- 19,5	19	5	0,45
10	19,5- 21	19,8	5	0,59
30	21,5- 22,5	21,8	5	0,50
50	23 - 24,5	23,8	5	0,74
100	25 - 26,5	25,8	5	0,60

- b. Zur Prüfung der Reproduzierbarkeit der Hemmhöfe von Blutproben gleicher Konzentration auf gleichen Testplatten wurden jeweils ein Neugeborenes mit 10 g und ein Erwachsener mit 50 g D-Galaktose belastet und von beiden Versuchspersonen nach 1 Stunde mehrere Blutproben abgenommen.

Tabelle 6: Gleiche Blutproben auf gleichen Testplatten

Versuchsperson Nr.	Durchmesser der Hemmhöfe (mm)		Zahl der Beobachtungen pro Testplatte	Standardabweichung
	Streubreite	Mittelwert		
1	21,5 - 23,5	22,3	13	0,70
2	20 - 22,5	21,2	16	0,86

c. Tabelle 7: Gleiche Kontrollplättchen auf verschiedenen Testplatten

Galaktosekonzentration der Kontrollplättchen (mg%)	Durchmesser der Hemmhöfe (mm)		Zahl der verschiedenen Testplatten	Standardabweichung
	Streubreite	Mittelwert		
6	15,5 - 18,5	16,7	50	0,87
10	16 - 18,5	17,3	50	0,77
30	18 - 21	19,4	50	0,69
50	20 - 23	21,3	50	0,57
100	22 - 24,5	23,2	50	0,55

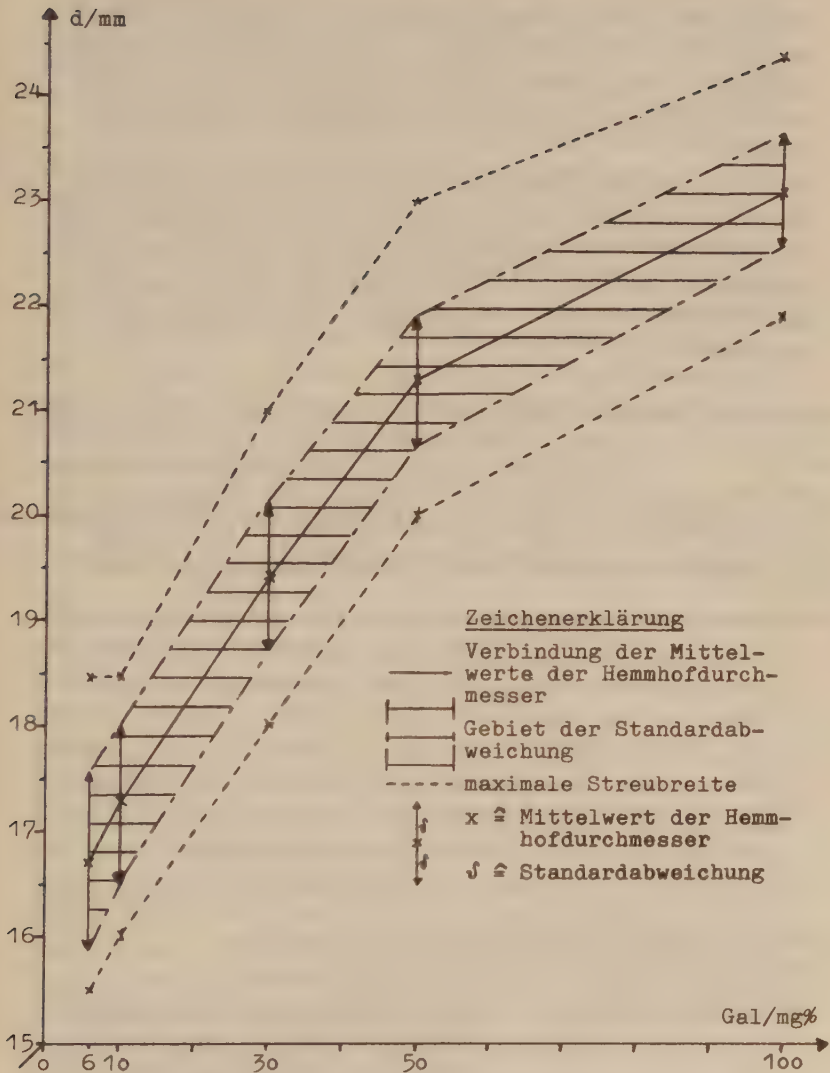


Abb. 1: Abhängigkeit des Hemoconcentrationdiameter d von der Galaktosekonzentration (Gal) der Kontrollplättchen (Tabelle 7)

- d. Um die Reproduzierbarkeit der Hemmhöfe gleicher Blutproben auf verschiedenen Testplatten zu prüfen, wurden einige Neugeborene mit jeweils 10 g D-Galaktose belastet und nach 1 Stunde von jedem Neugeborenen mehrere Blutproben abgenommen und auf verschiedene Testplatten gelegt.

In der folgenden Tabelle werden die Hemmhofdurchmesser für die verschiedenen Blutproben einzeln aufgeführt und zu jedem Wert die entsprechende Galaktosekonzentration angegeben, um die unterschiedliche Beurteilung der einzelnen Blutproben auf verschiedenen Testplatten deutlich zu machen.

Tabelle 8: Gleiche Blutproben auf verschiedenen Testplatten

Blutprobe von Kind Nr.	Testplatte A		Testplatte B		Testplatte C		Testplatte D	
	Ø (mm)	Gal (mg%)	Ø (mm)	Gal (mg%)	Ø (mm)	Gal (mg%)	Ø (mm)	Gal (mg%)
								1)
1	23	100	24	>100	22	50-100	23	100
2	22,5	50-100	21,5	50	22	50-100	21	50
3	15	< 6	16	6	14	< 6	14	< 6
4	21	50-100	20,5	50	22	50	21	50
5	23	100	21,5	50-100	22	50-100	22	50-100
6	22,5	100	21	50	22	50-100	22,5	50-100
7	18,5	30	19	30	19,5	30	18	10-30

1) Ø ≙ Durchmesser der Hemmhöfe der Blutproben

Gal ≙ Galaktosekonzentration der Blutproben

Testplatte A, B, C, D = verschiedene Testplatten, wobei die Blutproben von Kind 1 - 7 nicht alle jeweils auf Testplatte A, B, C oder D liegen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß bei der Prüfung der Reproduzierbarkeit der Hemmhöfe gleicher Kontrollplättchen und gleicher Blutproben auf gleichen und auf verschiedenen Testplatten Schwankungen auftraten, die im allgemeinen etwas kleiner bei den Versuchen waren, bei denen gleiche Plättchen auf gleichen Testplatten lagen und etwas größer bei den Versuchen, bei denen gleiche Plättchen auf verschiedenen Testplatten lagen. In Abb. 1 ist die Tabelle 7 graphisch dargestellt. Sie gibt die Meßgenauigkeit des Testes wieder. Abgesehen von den 6 mg%-Werten liegen alle Standardabweichungen in einem Bereich, der eine eindeutige Unterscheidung zwischen 10mg% und 30mg%, 30mg% und 50mg% und 50mg% und 100mg% erlaubt. Im Streubreitenbereich zeigt sich allerdings ein Überschneiden der einzelnen Werte.

D. Vergleichende Galaktosebestimmung: Im GUTHRIE-Test und als Differenz von Gesamtreaktion und "wahrer Glukose"

Es wurden 2 Erwachsene jeweils mit 50 g D-Galaktose belastet und die Werte von 30, 60 und 90 Minuten nach Belastung im Galaktosämietest abgelesen. Nach gleichen Zeiten wurde die Galaktose als Differenz von Gesamtreaktion (HAGEDORN-JENSEN) und "wahrer Glukose" bestimmt. Die "wahre Glukose" wurde enzymatisch mit Hexokinase und Glukose-6-Phosphatdehydrogenase als Zwischenferment erfaßt. Bei vorausgehenden Bestimmungen von wäßrigen Glukose-Galaktose-Standardlösungen ergab sich, daß im HAGEDORN-JENSEN-Test etwa 20 % des Gesamtzuckers nicht erfaßt wurden. Dies wurde bei den folgenden Ergebnissen berücksichtigt. Die Differenz zwischen HAGEDORN-JENSEN und enzymatischer Glukosebestimmung beim Nüchternwert wurde als unspezifische Restreaktion aufgefaßt und bei den endgültigen Ergebnissen nicht bewertet.

Es ergaben sich folgende Resultate:

Person A:

Zeit	Galaktose = Gesamtreaktion - "wahre Glukose" (mg%)	Galaktose im GUTHRIE-Test (mg%)
vor Belastung (B.)	0	0
30 Min. nach B.	72	100
60 Min. nach B.	96	100
90 Min. nach B.	72	50 - 100

Person B:

Zeit	Galaktose = Gesamtreaktion - "wahre Glukose" (mg%)	Galaktose im GUTHRIE-Test (mg%)
vor Belastung (B.)	0	0
30 Min. nach B.	45	50
60 Min. nach B.	39	50
90 Min. nach B.	10	10

Es ergab sich also eine relativ gute Übereinstimmung der Galaktosebestimmung im GUTHRIE-Test und als Differenz von Gesamtreaktion und "wahrer Glukose", obgleich zu einer endgültigen Aussage eine größere Anzahl von Parallelbestimmungen notwendig wäre.

4. Technische Fehlermöglichkeiten

A. Verunreinigung der Testplatte

Die Verunreinigung diente als Zeichen, daß nicht unter genügend keimarmen Kautelen gearbeitet wurde. Als Folge ließen sich die Hemmhöfe nicht mehr deutlich ablesen. Im Gegensatz zum GUTHRIE-Test für die Phenylketonurie und die Leucinose empfiehlt es sich unbedingt, Medium und Agar zu autoklavieren, da sonst durch Verunreinigung mit anderen Bakterien die Auswertung des Testes beeinträchtigt wird.

B. Unspezifische Hemmung durch ungenügend lange Trocknung der Blutplättchen nach Behandlung mit Eisessigdampf

Kontrollplättchen von 100 mg%, die 3 - 6 Stunden nach Behandlung mit Eisessigdampf getrocknet waren, zeigten einen Hemmhof von 24,5 mm Durchmesser. Im gleichen Versuch zeigten Kontrollplättchen von 100 mg%, die sofort nach Herausnahme aus der mit Eisessigdampf gesättigten Box auf die Testplatte gelegt wurden, einen Hemmhof von 29 mm Durchmesser. Zur Ausschaltung dieses Hemmfaktors sollte eine Mindesttrockenzeit von 3 Stunden eingehalten werden, wobei die Plättchen zum Trocknen nebeneinander ausgebreitet liegen sollten.

C. Alterung der benutzten Kontrollplättchen

Zur Prüfung der Haltbarkeit der Kontrollplättchen wurden die Hemmhöfe neu hergestellter Kontrollplättchen mit denen alter Plättchen verglichen, die schon 3 Monate im Exsikkator bei 2 - 4 °C gelagert waren.

Die unterschiedlichen Ergebnisse für die alten und neuen Plättchen auf der gleichen Testplatte zeigt die Tabelle 9.

Tabelle 9: Hemmhofdurchmesser der alten und neuen Kontrollplättchen auf der gleichen Testplatte

Zahl der Versuche	Galaktosekonzentration der Kontrollplättchen (mg%)	Mittelwerte der Durchmesser (mm)	
		alte Plättchen	neue Plättchen
10	6	16,8	17,9
10	10	17,1	18,5
10	30	19,7	20,7
10	50	21,8	23,0
10	100	23,3	24,8

Eine Differenz der Hemmhofgröße von mindestens 1 mm läßt sich zwischen den 3 Monate alten und den frischeren Kontrollplättchen feststellen. Um diese Fehlerquelle auszuschalten, empfiehlt es sich, alle 3 Monate neue Kontrollblutplättchen herzustellen.

D. Mehrmaliges Auftropfen eines Blutropfens auf einen Fleck

Ein Neugeborenes wurde mit 10 g D-Galaktose belastet. Nach 1 Stunde wurden mehrere Blutproben abgenommen. Normales ein- bis zweimaliges Auftropfen auf einen Fleck zeigte im Galaktosämietest bei 13 Blutropfen einen Hemmhof von durchschnittlich 22,5 mm Durchmesser, fünfmaliges Auftropfen, wobei der entstandene Fleck nicht sehr viel größer als bei zweimaligem Auftropfen zu sein braucht, zeigte bei 5 Proben im gleichen Test einen Hemmhof von durchschnittlich 24 mm Durchmesser.

Es ist dies eine Fehlermöglichkeit, die sich der Kontrolle der untersuchenden Person entzieht und vielleicht durch Hinweise auf den vorgedruckten Testkarten verringert werden könnte.

Im Gegensatz zum GUTHRIE-Test für die Leucinose ist die Brutzeit ohne Einfluß auf die Hemmhofgröße im Sinne einer Verkleinerung derselben durch Weiterwachsen der Bakterien während einer zu langen Brutzeit. Die Hemmhofgröße bleibt die gleiche sowohl nach 15 wie auch nach 48 Stunden Brutzeit.

V. Resultate

1. Routinemäßige Untersuchung von Neugeborenen

Es wurden insgesamt 5097 Neugeborene zum größten Teil aus Hessen, Hannover und Bremen auf Galaktosämie untersucht.

	Hessen	Hannover	Bremen	Aus anderen Städten bzw. Bundesländern
Zahl der Untersuch- ten	3239	1404	365	89

Keines der untersuchten Kinder war jünger als 4 Tage, keines älter als 4 Wochen. Das Häufigkeitsmaximum lag bei einem Alter von 5 - 9 Tagen. Der weitaus größte Teil der Kinder wurde teil- oder vollgestillt, so daß für einen Vergleich der Galaktosekonzentration mit nur künstlich ernährten Kindern kein genügendes Untersuchungsmaterial vorliegt. Insgesamt waren die Hemmhöfe von 254 Blutproben meßbar. Von 5019 Reifgeborenen waren 248 Hemmhöfe meßbar, 243 davon lagen unter einem Galaktosewert von 6 mg%, 3 entsprachen 6 mg%, 1 Hemmhof lag zwischen 6 und 10 mg% und 1 weiterer Hemmhof lag bei 10 mg%. Von 78 Frühgeborenen waren 6 Hemmhöfe meßbar, 5 lagen unter 6 mg%, 1 Hemmhof entsprach 6 mg%. Bei den Fällen ohne meßbaren Hemmhof

muß angenommen werden, daß der Galaktosegehalt des Blutes wesentlich unter 6 mg% lag.

Tabelle 10a: Absolute Verteilung der Zahl der Untersuchten

	Zahl der Untersuchten	Zahl der Fälle ohne Hemmhof (« 6mg% Gal) 1)	Zahl der Fälle mit einer Galaktosekonzentration von: 2)			
			<6mg%	6mg%	6-10mg%	10mg%
I.						
1.Reifgeborene	5019	4771	243	3	1	1
2.Frühgeborene	78	72	5	1	0	0
II.						
Gesamtzahl der Untersuchten	5097	4843	248	4	1	1

Tabelle 10b: Prozentuale Verteilung der Untersuchten

	Prozentsatz der Untersuchten	% der Fälle ohne Hemmhof (« 6mg% Gal) 1)	% der Fälle mit einer Galaktosekonzentration von: 2)			
			<6mg%	6mg%	6-10mg%	10mg%
I.						
1.Reifgeborene	98,4	95,1	4,8	0,06	0,02	0,02
2.Frühgeborene	1,6	92,3	6,4	1,3	0	0
II.						
Gesamtheit der Untersuchten	100	95,01	4,87	0,08	0,02	0,02

1) und 2) siehe Fußnote Seite 31

Der Anteil der meßbaren Hemmhöfe lag bei den Frühgeborenen mit 7,7 % etwas höher als bei den Reifgeborenen mit 4,9 %. (Im Fall der Frühgeborenen ist allerdings die sehr viel kleinere Untersuchungszahl zu beachten.)

Im Verlauf dieser Massentestung fiel eine sehr ungleichmäßige Verteilung der Zahl der meßbaren Hemmhöfe auf die einzelnen Testplatten auf. Von 85 Testplatten zeigten 36 keinen Hemmhof, obwohl die Hemmhöfe der Kontrollplättchen normal groß und deutlich waren, 8 Testplatten zeigten Hemmhöfe, die zahlenmäßig wie folgt verteilt waren:

Testplatte Nr.	Zahl der Hemmhöfe
1	38
2	34
3	34
4	22
5	16
6	10
7	9
8	7

Die übrigen Testplatten hatten eine Hemmhofzahl von durchschnittlich 2,3 ($\pm 1,3$). Unter diesen befanden sich die gemessenen Werte von 6 - 10 mg% der Tabelle 10. Diese Beobachtung betont die Ungenauigkeit der Methode bei sehr niedrigen Galaktosekonzentrationen unter 10 mg%. Tabelle 10, die die Verteilung der gemessenen kleinen Hemmhöfe auf die Zahl der Untersuchten wiedergibt, kann

Fußnote zu Seite 30:

- 1) Gal $\hat{=}$ Galaktosekonzentration
- 2) Die Verteilung auf <6, 6, 6 - 10 und 10 mg% ist nur mit Vorbehalt zu betrachten, da die Meßgenauigkeit des Testes im Bereich zwischen 6 mg% und 10 mg% gering ist, wie Abb. 1 auf Seite 23 zeigt..

daher nur mit Vorbehalt betrachtet werden.

2. Galaktosebelastungen bei Neugeborenen

Um das Verhalten der Galaktosekonzentrationen im Blut unter Belastungsbedingungen zu studieren, wurden an 40 Neugeborenen im Alter von 2 - 7 Tagen Galaktosebelastungen durchgeführt. Jedes Kind bekam statt einer Milchmahlzeit 10 g D-Galaktose in 60 cm³ Tee gelöst. Kein Kind war nach der Mahlzeit auffällig. Durchfallstörungen traten nicht auf. Die nach 1 Stunde abgenommenen Blutproben zeigten im Galaktosämietest sehr unterschiedliche, von Alter und Gewicht unabhängige Werte.

Tabelle 11: Galaktosekonzentration im Blut von 40 Neugeborenen 1 Stunde nach Belastung mit jeweils 10 g D-Galaktose

Galaktosekonzentration (mg%)	Zahl der Neugeborenen
« 6 (kein Hemmhof)	4
< 6 (Hemmhofspur)	15
6	4
6 - 10	1
10	2
10 - 30	1
30	4
50	3
50 - 100	2
100	2
> 100	2

Fast die Hälfte der Neugeborenen zeigte nach Belastung einen Galaktoseblutspiegel unter 6 mg%, die andere Hälfte zeigte eine gleichmäßige Verteilung auf die Galaktosekonzentrationen von 6 mg% bis über 100 mg%.

Die große Schwankungsbreite der Ergebnisse ist zum Teil wohl auf die individuell unterschiedliche Resorption im Darm zurückzuführen, zumal die angebotene Flüssigkeitsmenge sehr groß war. Auch die individuell unterschiedliche Reife des Uridyltransferase-Systems kurz nach der Geburt könnte divergente Belastungsergebnisse bewirken. Von 20 Neugeborenen wurde Blut sowohl 1 Stunde als auch 2 Stunden nach Belastung abgenommen. Im Galaktosämietest lag bei 15 Kindern das Maximum des Galaktoseblutspiegels bei 1 Stunde nach Belastung, bei 5 Kindern fand sich nach 2 Stunden ein weiterer geringer Anstieg der Galaktosekonzentration im Blut.

3. Galaktosebelastung zweier Patienten

Ein 1 9/12 und ein 1 4/12 Jahre altes Kind, bei denen eine manifeste Galaktosämie bestand und die seit über einem Jahr galaktosefrei ernährt worden waren, wurden jeweils mit 1,75 g D-Galaktose / kg Körpergewicht belastet. Die vor und nach Belastung abgenommenen Blutproben zeigten im Galaktosämietest folgende Hemmhofdurchmesser und annähernde Galaktosekonzentrationen:

a.) P.S., 1 4/12 J.

Zeit	Durchmesser der Hemmhöfe (mm)	Annähernde Galaktosekonzentration (mg%)
vor Belastung (B)	0	0
30 Min. nach B.	21,5	50
60 Min. nach B.	27,5	>100
90 Min. nach B.	28	>100
120 Min. nach B.	28,5	>100

Die Kontrollplättchen auf der gleichen Testplatte zeigten folgende Hemmhofgrößen:

Galaktosekonzentration der Kontrollplättchen (mg%)	Durchmesser der Hemmhöfe (mm)
6	15,5
6	15,5
10	16
10	16
30	19
30	20
50	21,5
100	23,5

Die Blutproben des zweiten Kindes zeigten folgende Resultate:

b.) R.R., 1 9/12 J.

Zeit	Durchmesser der Hemmhöfe (mm)	Annähernde Galaktose- konzentration (mg%)
vor Belastung (B)	0	0
30 Min. nach B.	27,5	> 100
60 Min. nach B.	28,5	> 100
90 Min. nach B.	30	> 100
120 Min. nach B.	30	> 100

Dazu die Hemmhofgröße der Kontrollplättchen auf der gleichen Testplatte:

Galaktosekonzentration der Kontrollplättchen (mg%)	Durchmesser der Hemmhöfe (mm)
6	15,5
6	15,5
10	16
10	16
30	18
30	18
50	19,5
100	22,5

Beide Kinder zeigten nach Belastung eine abnorm hohe Galaktosekonzentration im Blut. Im ersten Fall war nach 1 Stunde ein Wert von weit über 100 mg% erreicht, im zweiten Fall schon nach 30 Minuten. Bei beiden Kindern zeigte der Galaktosespiegel 2 Stunden nach Belastung noch keine abfallende Tendenz.

Bei einem Vergleichskind im Alter von 1 1/2 Jahren fand sich nach Belastung nur ein ganz geringer Anstieg der Galaktose im Blut, der noch unter einem Wert von 6 mg% lag. (Vergleiche auch Abb. 2 auf Seite 38). Im Fall von Galaktosebelastungen wäre es zweckmäßig, Kontrollplättchen von 200 und 300 mg% einzuführen.

4. Galaktosebelastungen bei Heterozygoten und normalen Vergleichspersonen

Die Eltern der oben beschriebenen Patienten wurden jeweils mit 50 g D-Galaktose belastet.

Die vor und nach Belastung abgenommenen Blutproben zeigten im Galaktosämietest folgende Galaktosekonzentrationen:

a.) Eltern S.:

Zeit	Galaktosekonzentration im Blut (mg%)	
	Vater S., 45 J.	Mutter S., 45 J.
vor Belastung (B)	0	0
30 Min. nach B.	50 - 100	100
60 Min. nach B.	> 100	> 100
90 Min. nach B.	100	50 - 100
120 Min. nach B.	10 - 30	6

b.) Eltern R.:

Zeit	Galaktosekonzentration im Blut (mg%)	
	Vater R., 45 J.	Mutter R., 40 J.
vor Belastung(B)	0	0
30 Min. nach B.	100	100
60 Min. nach B.	30	> 100
90 Min. nach B.	10 - 30	100
120 Min. nach B.	< 6	30

c.) Vergleichspersonen, die ebenfalls mit 50 g D-Galaktose belastet wurden:

Zeit	Galaktosekonzentration im Blut (mg%)						
	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP ¹⁾
	Nr.1 26J.	Nr.2 24J.	Nr.3 47J.	Nr.4 30J.	Nr.5 37J.	Nr.6 10J.	Nr.7 10J.
vor Belastung(B)	0	0	0	0	0	0	0
30 Min. nach B.	6	100	6	50	30	>100	>100
60 Min. nach B.	6	>100	50	50	30	>100	>100
90 Min. nach B.	6	>100	<6	6-10	<6	>100	>100
120 Min. nach B.	0	6	0	0	0	6	50

Eine eindeutige Trennung Heterozygoter von Normalpersonen läßt sich nach diesen Untersuchungen nicht vornehmen (siehe auch Abb. 3 auf Seite 38).

1) VP ≙ Vergleichsperson

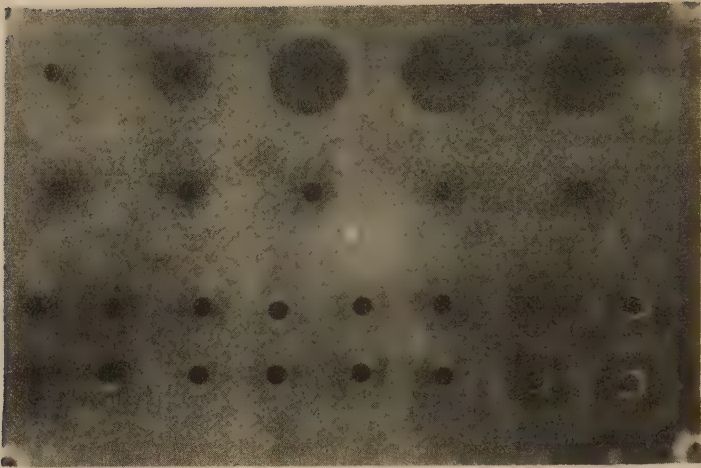


Abb. 2: Galaktosebelastung bei einem Patienten und zum Vergleich Galaktosebelastung bei einem gesunden Kind. (Erklärung siehe Seite 39)

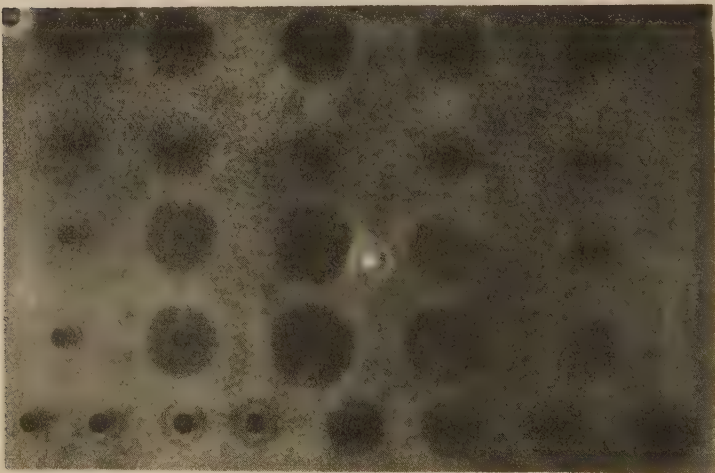


Abb. 3: Galaktosebelastungen bei Heterozygoten und bei zwei normalen 10-jährigen Kindern. (Erklärung siehe Seite 39)

Erklärung der Abbildungen 2 und 3 auf Seite 38

Abb. 2 zeigt die Testplatte mit den Blutproben des Patienten P.S., 1 9/12 J., vor und nach Belastung mit 1,75 g D-Galaktose / kg Körpergewicht. (Aufzählung jeweils von links nach rechts)

Oberste Reihe: Hemmhöfe der Blutproben vor Belastung, 30, 60, 90 und 120 Minuten nach Belastung.

2. Reihe: Hemmhöfe der Blutproben eines gesunden Vergleichskindes vor Belastung, 30, 60, 90 und 120 Min. nach Belastung.

3. und 4. Reihe: Hemmhöfe der Kontrollplättchen aufsteigender Konzentration: 6 mg%, 6mg%, 10 mg%, 10 mg%, 30 mg%, 30 mg%, 50 mg% und 100 mg%.

Abb. 3 zeigt die Testplatte mit den Blutproben der Eltern des Patienten R.R. und den Blutproben zweier normaler 10-jähriger Kinder vor und nach Belastung mit 50 g D-Galaktose. (Aufzählung jeweils von links nach rechts)

Oberste Reihe: Hemmhöfe der Blutproben der Mutter von R.R. vor Belastung, 30, 60, 90 und 120 Minuten nach Belastung.

2. Reihe: Hemmhöfe der Blutproben des Vaters von R.R. vor Belastung, 30, 60, 90 und 120 Minuten nach Belastung.

3. und 4. Reihe: Jeweils die Hemmhöfe der Blutproben eines 10-jährigen Kindes vor und nach Belastung.

Unterste Reihe: Die Hemmhöfe der Kontrollplättchen: 6 mg%, 6 mg%, 10 mg%, 10 mg%, 30 mg%, 30 mg%, 50 mg% und 100 mg%.

VI. Diskussion

Die Behauptung von HARTMANN (29) und DORMANDY (15), daß bei einem gesunden Säugling nach einer gewöhnlichen Milchmahlzeit ein Galaktoseanstieg bis über 30 mg%, ja bis über 60 mg% möglich sei, konnte in dieser Arbeit nicht in vollem Umfang bestätigt werden. Die überwiegende Zahl der Blutproben, von denen sicher einige kurz nach Milchfütterung abgenommen worden waren, zeigte einen wesentlich niedrigeren Galaktosespiegel. Nur in einem Fall fand sich ein Wert von 10 mg%, alle anderen lagen darunter. GUTHRIE testete ebenfalls 3000 Neugeborene. Er fand keinen Wert, der über oder bei 10 mg% lag (23). Der einheitlich niedrige Galaktosespiegel, der bei einer großen Zahl von Untersuchungen gefunden wurde, stellt eine gute Basis zur Auffindung pathologischer Galaktosewerte von 30 mg% bis weit über 100 mg% dar. Über negative Ergebnisse trotz Bestehen einer Galaktosämie läßt sich keine sichere Aussage machen. Sie wären möglich, wenn der galaktosämische Säugling wenig oder keine Milch aufnimmt, was in erster Linie denkbar wäre, wenn das Kind häufig Durchfälle hat, erbricht und infolge seines schwerkranken Zustandes milchfrei ernährt wird. Da SCHWARZ (49) jedoch ein längeres Persistieren des Gal-1-P in den galaktosämischen Erythrozyten nachwies, noch zu einer Zeit, in der der Urin schon frei von Galaktose war, ist letztere Möglichkeit mit einigen Vorbehalten zu betrachten. Auch ein erst nach dem 4. Lebenstag ansteigender Galaktoseblutspiegel ist unwahrscheinlich, da erhöhte Galaktosekonzentrationen bei vorliegender Krankheit von SCHWARZ und Mitarb. schon im Nabelschnurblut nachgewiesen wurden (49). Immerhin wäre es möglich, daß "formes frustes" der Krankheit mit langsam und geringfügig ansteigenden Galaktoseblutkonzentrationen bei diesem Testverfahren nicht erfaßt werden.

Im folgenden sei die Spezifität des Galaktosämietestes erörtert. Da L-Valin in den Konzentrationen von 4 - 6 mg% und L-Glycin in der Konzentration von 16 mg% im Galaktosämietest ebenfalls einen Hemmhof machen, der unter 6 mg% liegt, stellt sich die Frage nach der Spezifität der bei der Massentestung gemessenen Werte (siehe Seite 30). Der Glycin-Normalbereich im Plasma liegt weit unter 16 mg%, der Valin-Normalbereich gering unter 4 mg% ($(2,91 \pm 0,9) \text{mg\%}$ nach SNYDERMAN (55)), eine pathologische Erhöhung kann aber schon bei einem Wert von 6 mg% angenommen werden (siehe Seite 68). Jeder einzelne der bei der Massentestung gemessenen Hemmhöfe ist also verdächtig auf eine pathologische Glycinerhöhung, wie sie z.B. im Fall der Glycinose, einer anderen schweren angeborenen Stoffwechselanomalie, beschrieben worden ist (47), oder auf eine Valinerhöhung, z.B. im Fall der Leucinose (siehe Teil II) oder der Valinämie (57).

In 14 Fällen wurde der Versuch einer genaueren Aussage über die Natur der Hemmhöfe unternommen. Da Galaktosekontrollplättchen besonders der niedrigen Konzentrationen nach Autoklavieren (15 Minuten bei einem Druck von 1,5 bis 2 atü) keine Hemmhöfe zeigten (das nicht diffusionsfähige Gal-1-P wird erst durch Behandlung mit Eisessig zu freier diffusionsfähiger Galaktose gespalten (23)), Valin und Glycin hingegen auch nach Autoklavieren frei diffundieren können, wurden 14 der unter 6 mg% gemessenen Werte nach der üblichen Eisessigbehandlung im Galaktosämietest wiederholt; 14 gleiche Blutproben, die aber autoklaviert waren, wurden dann auf die gleiche Testplatte gelegt. Nach Bebrütung zeigten weder die mit Eisessig behandelten noch die autoklavierten Blutproben einen Hemmhof. Der Grund für das Mißlingen dieses Versuches liegt wohl in der oben (Seite 31) beschriebenen zahlenmäßig uneinheitlichen Verteilung der kleinen meßbaren Hemmhöfe auf die verschiedenen Testplatten, die es schwierig machte, diese auf jeder Testplatte zu wiederholen.

Eine andere Möglichkeit zur Identifizierung der hemmenden Substanz, wie sie GUTHRIE zur endgültigen Bestätigung allerdings nur des positiven Galaktosämiefalles vorschlägt (23), wäre der Vergleich der Ergebnisse bei Benutzung der galaktoseempfindlichen Mutante von *E. coli* und bei Benutzung des galaktoseresistenten Elternstammes. Im ersten Versuch würde man auf jeden Fall einen Hemmhof erwarten, im zweiten nur dann, wenn die aktive Substanz im Blut Valin oder Glycin gewesen wäre. Eine weitere Identifizierungsmöglichkeit der hemmenden Substanz zur Bestätigung eines positiven Falles sieht GUTHRIE in der Verwendung der betreffenden Blutprobe zur aufsteigenden eindimensionalen Papierchromatographie (22). In diesem Fall müßte dann neben einem Zuckerchromatogramm auch ein Aminosäurechromatogramm hergestellt werden. Aus jedem Feld der getrockneten Chromatogramme werden schmale Streifen herausgeschnitten und auf eine gewöhnliche Testplatte gelegt. Die restlichen Chromatogramme werden zum Vergleich auf die für Zucker oder Aminosäuren übliche Weise gefärbt. Nach Bebrütung der Testplatte entsteht dann auf dem Nährboden ein Hemmhof entweder an für Galaktose oder für Valin oder Glycin charakteristischen Stelle.

Es ist natürlich schwer möglich und äußerst unrentabel, in jedem Fall der gemessenen kleinen Hemmhöfe eine Identifizierung der hemmenden Substanz vorzunehmen, zumal die kleinen Hemmhöfe eine schlechte Reproduzierbarkeit aufweisen. Falls beide Tests, der GUTHRIE-Test für die Galaktosämie und der GUTHRIE-Test für die Leucinose, eingeführt sind, bietet sich als einfachste und rentabelste Möglichkeit zur Ausschaltung wenigstens des Leucinoseverdacht eine gleichzeitige Untersuchung der betreffenden Blutproben im Leucinose-Test an.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß der Hemmtest geeignet ist, einen wirklich positiven Galaktosämiefall (d.h. einen signifikant vergrößerten Hemmhof) zu erkennen und somit seinen Sinn als Massentest auf Galaktosämie voll

erfüllt. Bei jedem Verdacht auf einen positiven Fall muß allerdings die hemmende Substanz weiter identifiziert werden. Ebenso bietet die Unspezifität des Testes keinen eigentlichen Nachteil, da in jedem Fall, sei die hemmende Substanz Galaktose, Valin oder Glycin, das Vorliegen einer Stoffwechselstörung angenommen werden muß.

Die Frage nach der Eignung des Testes als Heterozygotentest muß verneint werden. Auch andere Galaktosetoleranzteste eignen sich nicht zur Identifizierung heterozygoter Träger des Galaktosämie-Gens. Die bei Galaktosebelastung von 4 Heterozygoten auftretenden Werte zeigten nach den vorliegenden Untersuchungen keine deutliche Abweichung von denen normaler Vergleichspersonen und lassen somit eine scharfe Abgrenzung der Heterozygoten nicht zu.

Auch HOLZEL und KOMROWER (30), die 1955 als erste mittels Galaktosebelastungsteste Heterozygote zu identifizieren versuchten, konnten keine klare Trennung nachweisen. Unter 20 Mitgliedern von 5 Familien mit Galaktosämiekindern wurde nur in einem Fall bei beiden Eltern teilen eine reduzierte Galaktosetoleranz festgestellt. Von den restlichen 4 Familien zeigte jeweils nur ein Elternteil verminderte Toleranz. 1959 benutzten DONNELL, BERGREN und ROLDAN (13) zur Identifizierung von Heterozygoten ebenfalls den Toleranztest. Sie führten Belastungen an 39 Mitgliedern von 15 Familien mit Galaktosämiekindern durch. Obwohl rein statistisch die Gruppe der Väter und Mütter und Geschwister von Normalpersonen getrennt werden konnte, war die Überschneidung mit Normalpersonen im Einzelfall zu hoch. Eine wesentlich genauere Trennung ist durch die direkte Bestimmung der Uridyltransferaseaktivität möglich (8, 34, 31, 5).

Z W E I T E R T E I L

Ein mikrobiologischer Hemmtest für die Leucinose (Ahornsirup- krankheit)

I. Die Leucinose, Pathogenese und Klinik

Die Leucinose, 1954 von MENKES (42) zum ersten Mal beschrieben und seither in über 30 Fällen beobachtet (Literaturübersicht bei LINNEWEH und WILLENBOCKEL 1964 (38)) ist biochemisch gekennzeichnet durch die fehlende oder verminderte oxydative Decarboxylierung der Ketosäuren dreier verzweigtkettiger Aminosäuren: Leucin, Isoleucin und Valin (10, 41, 43). Die Folge dieses Enzymdefektes ist eine Anhäufung dieser Aminosäuren und ihrer Ketosäuren im Blut, Liquor und Urin. Eine sichere Aussage über die genaue Art des Enzymdefektes ist bis jetzt noch nicht möglich. Ein allen drei Ketosäuren gemeinsamer Abbauschritt auf der Stufe der Decarboxylierung wird von DANCIS und Mitarb. angenommen (11). Es fehlt bis jetzt ebenso noch eine Aufklärung über den genauen Schädigungsmechanismus der Aminosäuren (bzw. ihrer Ketosäuren) auf das Gehirn.

Klinisch zeigt die Leucinose fast immer einen schweren stürmischen Verlauf mit meist frühem Tod. Die Krankheitserscheinungen beginnen wenige Tage nach der Geburt und bestehen in Nahrungsverweigerung, Rigidität, Opisthotonus, Krämpfen, fehlendem Mororeflex, Atemstörung und dem typischen Uringeruch, der hierzulande am besten mit dem der Maggiwürze zu vergleichen ist und in Neuengland mit dem Geruch des Sirups des dort heimischen "Maple sugar"-Baumes verglichen wurde (daher "maple syrup-" oder "maple sugar urine disease" der Amerikaner). Der Tod tritt nach wenigen Tagen bis Wochen ein. Bei länger Überlebenden ist Schwachsinn das Hauptsymptom. "Formes frustes" mit normaler geistiger

und körperlicher Entwicklung, bei denen der Blutspiegel nur zeitweilig im Verlauf von Stresssituationen eine Erhöhung der betreffenden Aminosäuren aufwies, sind beschrieben worden (45, 40, 33). Die Häufigkeit der Erkrankung wird von WOOLF näher an 1 : 10 000 als an 1 : 100 000 geschätzt (60).

Die frühzeitige Erkennung der Krankheit ist wie bei der Galaktosämie von großer praktischer Bedeutung, da eine wirksame Therapie in Form einer leucin-, isoleucin- und valinarmen Diät zur Verfügung steht.

II. Die biochemische Diagnose der Leucinose. Die wichtigsten bisher bekannten Methoden

Die endgültige Diagnose der Leucinose beruht auf dem Nachweis der Anhäufung der drei Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin (bzw. ihrer Ketosäuren) im Blut oder auf der direkten Demonstration des Enzymdefektes.

Der GUTHRIE-Hemmtest für die Leucinose weist nur ganz speziell die Erhöhung des Leucins im Blut nach. Leucin ist im Fall der Leucinose die am stärksten erhöhte Aminosäure im Blut und erreicht hier Werte bis über 20 mg%, ja sogar bis über 60 mg% (normal: $1,74 \pm 0,6$ mg%). Der GUTHRIE-Hemmtest für die Leucinose hat gegenüber allen anderen Nachweismethoden, die mit Blut arbeiten, den Vorteil, daß eine einzige Person imstande ist, täglich bequem 300 Blutproben und mehr auf eine Leucinerhöhung zu untersuchen. Der Test läßt sich daher gut zur routinemäßigen Durchtestung einer großen Anzahl von Neugeborenen anwenden. Sein großer Vorteil liegt, wie schon früher für den Galaktosämietest beschrieben, besonders in der einfachen Gewinnung und Handhabung der Blutproben. Sie bestehen aus je einem Bluttropfen, der auf einem Stück Filterpapier getrocknet wird und auf diese Weise einen außerordentlich bequemen Transport zu einer zentralen Untersuchungsstelle sowie eine günstige Lagerung bei Zimmertemperatur auf wenig Platz erlaubt. Alle anderen Methoden ver-

langen frisches Blut, Plasma oder Serum in flüssigem Zustand, sind wesentlich zeitraubender und daher als Massentest nicht so gut geeignet.

Im folgenden seien zur Orientierung die wichtigsten der bisher bekannten Methoden zum Nachweis der Erhöhung der drei verzweigtkettigen Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin im Blut aufgezählt. Es sind dies drei Methoden, die nicht speziell zum Nachweis dieser drei Aminosäuren, sondern zur Bestimmung einer ganzen Reihe von Aminosäuren im Blut angewendet werden können, sowie eine Methode zur direkten Demonstration des Enzymdefektes.

1. Mikrobiologische Aminosäurenbestimmung, in einer vereinfachten Modifikation von SELIGSON u.a. (51)

Diese mikrobiologische Methode zur Aminosäurenbestimmung im Blut beruht auf dem Prinzip, daß gewisse milchsäurebildende Bakterien zu ihrem Wachstum bestimmte Aminosäuren benötigen. Zu einem Nährboden, dem die zu bestimmende Aminosäure fehlt und der mit dem für diese Aminosäure empfindlichen Bakterienstamm inokuliert ist, wird das unbekannte Plasmafiltrat gegeben. Hinzu kommt eine bekannte Menge einer Standardlösung der gesuchten Aminosäure. Die Menge der während der Inkubation gebildeten Säure wird titrimetrisch mit NaOH erfaßt. Der jeweilige Titrationswert wird zur Bestimmung der gesuchten Aminosäure benutzt.

Diese Methode ist präzise, aber aufwendig und benötigt 12 - 14 ml Vollblut.

2. Aminosäurenbestimmung mittels deszendierender zweidimensionaler Papierchromatographie nach CONSDEN, GORDON und MARTIN (9), in der Modifikation von BICKEL und SOUCHON (7)

Die verschiedenen Aminosäuren in einer Flüssigkeit werden auf einem Filterpapierbogen unterschiedlich weit transportiert nach Eintauchen dieses Bogens in ein Lösungsmittel, z.B. Phenol. Eine weitere Trennung erfolgt in einem zweiten Lauf, senkrecht zum ersten, mit einem anderen Lösungsmittel,

z.B. Collidin. Nach Färbung sind die Aminosäuren an charakteristischer Stelle als Flecke sichtbar. Eine semiquantitative Auswertung kann durch Vergleich der Aminosäuren unbekannter Konzentration mit Flecken von Taurin bekannter Konzentration erfolgen oder durch Vergleich mit Flecken entsprechender Testaminosäuren verschiedener Konzentrationen.

3. Die säulenchromatographische Methode nach MOORE, SPACKMAN und STEIN (44)

Diese Methode ist das beste bisher bekannte quantitative Verfahren zur Aminosäurenbestimmung. Hierbei erfolgt die Trennung der Aminosäuren an Kunstharzsäulen. Der Ninhydrinfarbwert der einzelnen Aminosäuren wird anschließend automatisch registriert. Eine Fehlerbreite von nur 3 % wurde von den Autoren angegeben. Die Zeit für eine Analyse beträgt allerdings zwei Tage, die benötigte Blutmenge 2 - 4 ml.

4. Direkter Nachweis des Enzymdefektes nach DANCIS u.a. (11)

Die sicherste Diagnose der Leucinose gelingt durch die direkte Demonstration des Enzymdefektes. Sie verlangt jedoch entsprechende Apparaturen. Die Methode von DANCIS beruht auf der Tatsache, daß normale Leukozyten fähig sind, die verzweigtkettigen Aminosäuren abzubauen, im Gegensatz zu den Leukozyten von Leucinose-Patienten (10). Die Leukozyten werden mit radioaktivem Leucin- C^{14} , Isoleucin- C^{14} und Valin- C^{14} inkubiert. Das entstehende $C^{14}O_2$ wird als Bariumsalz gefällt und dessen Radioaktivität gemessen. Zum Nachweis der erfolgten Transaminierung der Aminosäuren zu den entsprechenden Ketosäuren wird dem Inkubationsmedium 2,4-dinitrophenylhydrazin zugesetzt und die Radioaktivität der entstandenen und extrahierten Dinitrophenylhydrazone bestimmt.

Schließlich sei noch auf eine mikrobiologische Methode von BERRY, SCHEEL und MARKS (4) hingewiesen, die wie der GUTHRIE-Test mittels eines Filterpapierstückchens, das mit Untersuchungsmaterial getränkt ist, die Vermehrung von Leucin, Isoleucin und Valin allerdings im Urin nachweist. Auch diese

Methode eignet sich zur Untersuchung einer großen Zahl von Kindern auf Leucinose. Kleine, mit Urin getränkte Filterpapierstückchen werden auf Spezialmedien gelegt, denen jeweils eine der Aminosäuren fehlt, welche der Testorganismus, mit dem das Medium inokuliert wird, zu seinem Wachstum braucht. Wachstum tritt also nur dann auf, wenn der Urin die betreffende Aminosäure enthält.

III. Die mikrobiologische Methode nach ROBERT GUTHRIE (20)

1. Prinzip

Die Hemmung des Wachstums von *Bacillus subtilis* ATCC 6051 durch 2-Methylleucin auf einem Minimalnährboden wird durch L-Leucin verhindert.

Zur routinemäßigen Testung von Neugeborenen wird durch Hackenstich ein Tropfen Blut gewonnen und auf Filterpapier getropft. Aus dem Blutfleck wird mit einem gewöhnlichen Locher ein Plättchen ausgestanzt und auf den mit DL-2-Methylleucin versetzten und mit *Bacillus subtilis* ATCC 6051 inokulierten Nährboden gelegt. Die um diese Plättchen nach Bebrütung entstandenen Wachstumshöfe werden mit denen gleichgroßer Kontrollplättchen verglichen, die jeweils mit Blut verschiedener Leucinkonzentration getränkt und auf den gleichen Nährboden gelegt wurden.

2. Praktische Ausführung

A. Vorbereitung zum Versuch

a. Herstellung der Kontrollblutplättchen

Zitratblut im Verhältnis Vollblut : Zitratlösung (5%-ige Natriumzitratlösung) wie 9 : 1 wird verwendet. Der Gehalt des Vollblutes an L-Leucin wird mit Hilfe der Säulenchromatographie bestimmt.

Beispiel für die Herstellung einer 2 mg%-igen Blut-Leucinlösung

Der Gehalt des Vollblutes an Leucin beträgt 1,2 mg%

(säulenchromatographisch bestimmt).

Es werden 100 ml Zitratblut, 9 : 1 verdünnt, verwendet. Da 100 ml Vollblut 1,2 mg Leucin enthalten, ergibt sich: 90 ml Vollblut + 10 ml Zitratlösung enthalten 1,08 mg Leucin.

Um 100 ml einer 2 mg%-igen Blut-Leucinlösung herzustellen, müssen also 0,92 mg Leucin ergänzt werden. Dazu wird eine 1000 mg%-ige wäßrige Leucinlösung hergestellt.

100 ml Aqua dest enthalten 1000 mg Leucin

0,01 ml Aqua dest enthalten 0,1 mg Leucin

0,09 ml dieser Leucinlösung werden also in einen 100 ml fassenden Meßkolben pipettiert, dann wird mit dem ursprünglichen Zitratblut auf 100 ml aufgefüllt.

Entsprechend werden 4 mg%-ige, 6 mg%-ige, 8 mg%-ige, 12 mg%-ige und 20 mg%-ige Blut-Leucinlösungen hergestellt. Diese Lösungen werden mit einer Pipette so auf Filterpapier (Schleicher und Schüll Nr. 2992) getropft, daß mit einem Tropfen ein Blutfleck von etwa 10 mm Durchmesser entsteht und auch die Rückseite durchtränkt ist. Aus jedem dieser Flecken wird mit einem gewöhnlichen Locher ein Plättchen ausgestanzt und die Plättchen gleicher Konzentration in entsprechend gezeichneten Plastikbeuteln bei 2 - 4 °C im Exsikkator aufbewahrt. Sie hielten sich bis jetzt seit über einem halben Jahr unverändert.

b. Gewinnung der Blutproben von Neugeborenen

Mit einer scharfen Lanzette sticht man in die Hacke des Neugeborenen. Ein großer Tropfen Blut wird auf die vorgezeichneten Kreise der Testkarten getropft, so daß auch die Rückseite durchtränkt ist. Zum Versuch werden die Testkarten gleichzeitig mit den Kontrollplättchen 15 Minuten bei einem Druck von 1,5 - 2 atü autoklaviert. Dadurch koaguliert der Blutfarbstoff und seine Diffusion in den Agar während des Bebrütens wird verhindert.

c. Herstellung des Mediums

Bestandteile:

1.	K_2HPO_4	30,0 g
2.	KH_2PO_4	10,0 g
3.	NH_4Cl	5,0 g
4.	NH_4NO_3	1,0 g
5.	$Na_2SO_3 \cdot 7H_2O$	2,0 g
6.	Glutaminsäure	1,0 g
7.	Asparaginsäure $\cdot 1H_2O$	1,14 g
8.	L-Alanin	0,5 g

Salzlösung:

$MgSO_4$	$\cdot 7H_2O$	10,0 g
$MnCl_2$	$\cdot 4H_2O$	1,0 g
$FeCl_3$	$\cdot 6H_2O$	1,0 g
$CaCl_2$		0,5 g

D-Glukose	2,0 g
DL-2-Methyllleucin (Hemmstoff)	2,9 g
Agar-Agar	2,5 g

Bereitung:

1. Die Bestandteile der Salzlösung werden abgewogen und in 1 Liter destilliertem Wasser gelöst. Diese Lösung kann bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden und braucht für die folgenden Versuche nicht mehr erneuert zu werden.
2. Die Bestandteile des Mediums von 1. bis 8. werden abgewogen. Nachdem man 10 ml der Salzlösung dazupipetiert hat, wird auf 500 ml aufgefüllt, dann in einen 500 ccm fassenden Erlenmeyerkolben gefüllt und mit einem Stück Aluminiumfolie verschlossen. Die Lösung hält sich bei 2 - 4 °C etwa 3 Wochen.
3. Jeweils 2 g D-Glukose werden in kleine geeignete Fläschchen gefüllt und bei Zimmertemperatur aufbewahrt.
4. 2,5 g Agar-Agar (Agar-Agar, Firma Merck, Stuttgart)

werden in eine 300 ccm fassende Nährbodenflasche gegeben, dazu kommen 150 ml destilliertes Wasser.

5. 2,9 g DL-2-Methyllleucin werden abgewogen und mit destilliertem Wasser auf 200 ml aufgefüllt. Die Lösung wird in einer Plastikflasche eingefroren aufbewahrt.

d. Züchtung des Bacillus subtilis ATCC 6051 und Herstellung der fertigen Sporenaufschwemmung für den Versuch

Zu einer kleinen Menge gefriergetrockneter Sporen des Bacillus subtilis ATCC 6051 werden 1 - 2 ml 0,9 %-ige NaCl-Lösung hinzugegeben.

Eine Petrischale (Durchmesser 20 cm) mit Kartoffel-Agar wird vorbereitet. Dieser Agar wurde als Fertignährboden in Pulverform von der amerikanischen Firma Difco bezogen (Bacto Potato Infusion Agar 0051-01). Die Oberfläche des Agars wird dicht mit der Sporenaufschwemmung inokuliert. Nach etwa 3 Wochen Bebrütung bei 37 °C wird mikroskopisch auf Sporen geprüft. Dazu wird eine Sporenfärbung nach ZIEHL-NEELSEN durchgeführt. Sind im Ausstrich genügend Sporen vorhanden, werden die Sporen mit 0,9 %-iger Kochsalzlösung von der Oberfläche gewaschen. Die Suspension wird dann etwa dreimal zentrifugiert, wobei jedesmal der Überstand abdekantiert und dann frische 0,9 %-ige Kochsalzlösung hinzugegeben wird. Die endgültige Suspension soll eine optische Dichte von 0,9 haben. Diese wird mit destilliertem Wasser im Colemann-Photometer bei einem Filter von 550 μ hergestellt. 0,2 ml dieser Suspension werden in kleine sterile Fläschchen gefüllt, die dann mit einem sterilen Gummipfropf verschlossen werden.

B. Der Versuch

1. Der Agar wird im Wasserbad für etwa 15 Minuten zum Kochen gebracht und dann 15 Minuten in ein Wasserbad von 55 °C gestellt.
2. 2 g D-Glukose werden in einen 300 ccm fassenden Erlenmeyerkolben gegeben, dazu kommen 50 ml. Medium (aus

den Bestandteilen 1. - 8., siehe Seite 50). Diese Lösung wird ebenfalls für 15 Minuten in ein Wasserbad von 55 °C gebracht.

3. Dann werden die abgefüllten 0,2 ml Sporenaufschwemmung in die Mediumflasche gegeben und 9 ml 2-Methyllleucin hinzupipettiert. Die Menge des zu einem Versuch notwendigen Hemmstoffes muß nach Ansetzen der Lösung mit einer neuen Hemmstofflieferung neu bestimmt werden. Dazu macht man 2 Versuche, die sich nur durch die Menge des zugesetzten Hemmstoffes unterscheiden (der Hemmstoff hat jeweils die auf Seite 51 unter 5. angegebene Konzentration):

1. Versuch mit 2 ml Hemmstoff

2. Versuch mit 15 ml Hemmstoff

Da eine größere Menge Hemmstoff schärfere Begrenzung und kleinere Höfe zur Folge hat (siehe auch Abschnitt IV,1), wird je nach Ausfall der Wachstumshöfe mehr oder weniger Hemmstoff hinzugegeben.

4. Dann wird das kräftig geschüttelte Medium zu dem Agar in die Agarflasche gegeben. Anschließend wird beides zur besseren Durchmischung wieder zurück in die Mediumflasche geschüttet.
5. Ein flaches Plastiktablett (25 cm x 17 cm) wird mit 96 %-igem Alkohol ausgewaschen. Darunter wird eine entsprechende Papierschablone gelegt, auf der die Zahlen von 1 - 100 vorgezeichnet sind. Nun wird das inokulierte und mit Hemmstoff versetzte Medium vorsichtig hineingegeben, so daß keine Luftbläschen entstehen und die Flüssigkeit überall gleichmäßig hoch den Boden der Schale bedeckt.
6. Ist der Agar erstarrt, wird mit einem gewöhnlichen Locher aus den gesammelten Testkarten je ein Blutplättchen ausgestanzt und mit einer Pinzette auf den Agar gelegt, entsprechend den Zahlen der Schablone. Zum Schluß werden die Kontrollplättchen auf die unterste Reihe gelegt in folgender Reihenfolge:

2mg%; 2mg%; 4mg%; 4mg%; 6mg%; 6mg%; 8mg%; 12mg%; 20mg%

7. Die Platte wird mit einem passenden Plastikdeckel verschlossen und umgekehrt, mit dem Deckel nach unten, für etwa 15 Stunden in den Brutschrank gestellt.
8. Am nächsten Tag werden die Wachstumshöfe der Kontrollplättchen mit denen der Blutplättchen unbekannter Konzentration verglichen.

IV. Kritische Prüfung der Methode

1. Beeinflussung des Wachstumshofes durch die Hemmstoffmenge

Die Größe und die Schärfe der Begrenzung der Wachstumshöfe läßt sich durch die Menge des Hemmstoffes beeinflussen. Die ursprünglich von GUTHRIE angegebene Hemmstoffmenge für eine Testplatte betrug 2 ml einer 0,1-molaren Lösung (24). Damit ließen sich unter unseren Bedingungen zwar ziemlich große und mit den verschiedenen Konzentrationen einigermaßen unterschiedliche Wachstumshöfe darstellen, eine genaue Ausmessung dieser Höfe war jedoch nicht möglich, da ihre Begrenzung ausgesprochen unscharf war. Erst eine 3fache Menge (6 ml) ergab einhergehend mit einer Verkleinerung eine genügend scharfe Begrenzung der Wachstumshöfe. Nach Neuansetzen der Hemmstofflösung genügte erst eine Menge von 16 ml. Der Hemmstoff war bisher bei Zimmertemperatur aufbewahrt worden. Eine neue Sendung aus den Vereinigten Staaten wurde im Exsikkator bei 2 - 4 °C aufbewahrt. Von einer hiermit hergestellten Lösung wurden 9 ml benötigt. Der größte Teil der im folgenden beschriebenen Versuche wurde mit dieser Menge ausgeführt. Am Ende dieser Arbeit mußte die Hemmstoffmenge jedoch wieder auf 15 ml erhöht werden. Der Hemmstoff ist also nicht sehr beständig. Es empfiehlt sich, jeweils eine große Menge einer Lösung anzusetzen und diese dann gefroren aufzubewahren, da die verbrauchte Hemmstoffmenge bei Benutzung einer eingefrorenen Lösung relativ konstant blieb.

2. Spezifität und Genauigkeit der Methode

A. Einfluß von Antibiotika

Da der Leucinosetest den gleichen Bakterienstamm (*Bacillus subtilis* ATCC 6051) benutzt wie der GUTHRIE-Test für Phenylketonurie, wurde zur Resistenzbestimmung dieses Testorganismus auf eine frühere Untersuchung über den Phenylketonurietest zurückgegriffen (16):

Resistenzbestimmung für *Bacillus subtilis* ATCC 6051

empfindlich	schwach empfindlich	resistent
Sulfonamide	Streptomycin	Penicillin
Tetracycline	Kanamycin	Bacitracin
Chloramphenicol	Neomycin	Colistin
Erythromycin	Novobiocin	Cycloserin
Oleandomycin	Nitrofurantoin	Polymyxin

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden 5 unter Tetracyclinbehandlung und 4 unter Chloramphenicolbehandlung stehende Neugeborene im Leucinosetest untersucht. Davon zeigten 4 einen deutlichen Wachstumshof unter 2 mg%, 3 einen Wachstumshof von 2 mg%. Außerdem wurden Blutproben von 29 der Testkarten, die allgemein den Hinweis "Antibiotikabehandlung" trugen, untersucht. 23 zeigten einen Wachstumshof unter 2 mg% und 6 einen Wachstumshof von 2 mg%. Wie im GUTHRIE-Test für Phenylketonurie (16) ließ sich auch im Leucinosetest keine Abweichung der Blutproben antibiotikabehandelter Neugeborener vom Verhalten der Blutproben unbehandelter Neugeborener feststellen. Zu einer endgültigen Aussage im Einzelfall wären jedoch gleichzeitige Leucinbestimmungen der Blutproben antibiotikabehandelter Patienten mit einer anderen Methode notwendig.

B. Einfluß anderer physiologischer Substanzen im Blut

Es wurden jeweils 20 mg%-ige wäßrige Lösungen hergestellt von Alanin, Arginin, Asparagin, Asparaginsäure, Cystin, Glutamin, Glutaminsäure, Glycin, Leucin, Isoleucin, Lysin, Methionin, Ornithin, Prolin, Serin, Taurin, Threonin und Valin. Von diesen Lösungen wurde jeweils ein Tropfen auf Filterpapier getropft. Aus den getrockneten Flecken wurden mit einem Locher Plättchen ausgestanzt und auf den mit *B. subtilis* inokulierten Nährboden gelegt. Nach Bebrütung über Nacht trat nur bei dem Leucinplättchen ein Wachstumshof von 19,5 mm Durchmesser auf. Alle anderen Aminosäureplättchen, insbesondere Isoleucin, zeigten keine Wachstumszonen. Nach diesen Untersuchungen weist der GUTHRIE-Test für die Leucinose eine hohe Spezifität auf.

C. Reproduzierbarkeit und Meßgenauigkeit

Die Reproduzierbarkeit der Wachstumshöfe von Kontrollplättchen gleicher Leucinkonzentrationen und von Blutproben gleicher Leucinkonzentrationen wurde sowohl auf gleichen als auch auf verschiedenen Testplatten geprüft.

a. Tabelle 12: Gleiche Kontrollplättchen auf gleichen Testplatten

Leucinkonzentration der Kontroll- plättchen (mg%)	Zahl der Beobach- tungen pro Test- platte	Durchmesser der Wachstumshöfe (mm)	Streubreite	Mittelwert	Stan- dard- ab- wei- chung
Testplatte Nr. 1					
2	10	9 - 10,5		9,6	0,35
4	10	11 - 12		11,9	0,32
6	10	13 - 15		13,6	0,53
8	9	15 - 16		15,4	0,50
12	10	16,5 - 17,5		17,2	0,32
20	10	19 - 20		19,4	0,32

Fortsetzung der Tabelle 12:

Leucinkon- zentration der Kontroll- plättchen (mg%)	Zahl der Beobach- tungen pro Test- platte	Durchmesser der Wachstumshöfe (mm)	Streubreite	Mittelwert	Stan- dard- ab- wei- chung
Testplatte Nr. 2					
2	5	9 - 10	9,3	0,40	
4	5	10,5 - 10,5	10,5	0,0	
6	5	12,5 - 13,5	13	0,45	
8	5	14,5 - 15	14,6	0,39	
12	5	15 - 16,5	15,8	0,51	
20	5	17 - 18	17,4	0,58	
Testplatte Nr. 3					
2	5	9,5 - 9,5	9,5	0,0	
4	5	11,5 - 12,5	11,7	0,40	
6	5	12,5 - 13,5	12,9	0,37	
8	5	13 - 14	13,8	0,40	
12	5	15,5 - 17	15,8	0,60	
20	5	17 - 18	17,8	0,40	

- b. Zur Prüfung der Reproduzierbarkeit der Wachstumshöfe gleicher Blutproben auf gleichen Testplatten wurden 2 Erwachsene mit 5 g Leucin belastet und jeweils nach 2 und 3 Stunden mehrere Blutproben abgenommen. In der folgenden Tabelle 13 sind unter A die Ergebnisse der 2 Stunden nach Belastung abgenommenen Blutproben und unter B die Ergebnisse der 3 Stunden nach Belastung abgenommenen Blutproben zusammengestellt.

Tabelle 13: Gleiche Blutproben auf gleichen Testplatten

	Versuchsperson Nr.	Zahl der Beobachtungen pro Testplatte	Durchmesser der Wachstumshöfe (mm)		Standardabweichung
			Streubreite	Mittelwert	
A	1	6	12 - 14	12,7	0,75
	2	6	11 - 11,5	11,3	0,26
B	1	6	9,5 - 11	10,1	0,45
	2	6	7 - 8	7,8	0,34

c. Tabelle 14: Gleiche Kontrollplättchen auf verschiedenen Testplatten

Leucinkonzentration der Kontrollplättchen (mg%)	Zahl der verschiedenen Testplatten	Durchmesser der Wachstumshöfe (mm)		Standardabweichung
		Streubreite	Mittelwert	
2	30	8 - 11	9,1	0,61
4	30	9 - 12,5	11,1	0,73
6	30	11,5 - 14,5	12,9	0,69
8	30	14 - 17	14,9	0,74
12	30	15,5 - 19	16,6	0,95
20	30	17 - 20,5	18,2	0,78

d. Um die Reproduzierbarkeit der Wachstumshöfe gleicher Blutproben auf verschiedenen Testplatten zu prüfen, wurden 2 Erwachsene (Versuchsperson Nr.1: 47 Jahre, Versuchsperson Nr.2: 40 Jahre) mit je 5 g, ein 2-jähriges Kind (Versuchsperson Nr.3) mit 1,5 g und ein 3 Monate altes Kind (Versuchsperson Nr.4) mit 1 g L-Leucin belastet und nach 2 und 3 Stunden jeweils mehrere Blutproben gewonnen.

In der folgenden Tabelle werden jeweils die Durchmesser der Wachstumshöfe der Blutproben einzeln aufgezählt und zu jedem Wert die entsprechende Leucinkonzentration angegeben, um die unterschiedliche Bewertung auf verschiedenen Testplatten deutlich zu machen.

Tabelle 15: Gleiche Blutproben auf verschiedenen Testplatten

Versuchsperson Nr.	Testplatte A		Testplatte B		Testplatte C ¹⁾	
	∅ (mm)	Leucin. (mg%)	∅ (mm)	Leucin. (mg%)	∅ (mm)	Leucin. (mg%)
2 Stunden nach Belastung abgenommene Blutproben						
1	13,0	6	14,0	4 - 6	13,5	4 - 6
2	13,5	6 - 8	14,0	4 - 6	13,5	4 - 6
3	15,5	12	16,0	6 - 8	16,0	8
4	13,5	6 - 8	15,5	6	16,5	8 - 12
3 Stunden nach Belastung abgenommene Blutproben						
1	11,0	4	13,5	4 - 6	13,0	4
2	13,5	6 - 8	14,0	4 - 6	13,5	4 - 6
3	11,0	4	13,0	4	12,0	2 - 4
4	9,0	2	8,0	<2	10,0	<2

1) ∅ ≙ Durchmesser der Wachstumshöfe der Blutproben
Leucin. ≙ Leucinkonzentration der Blutproben

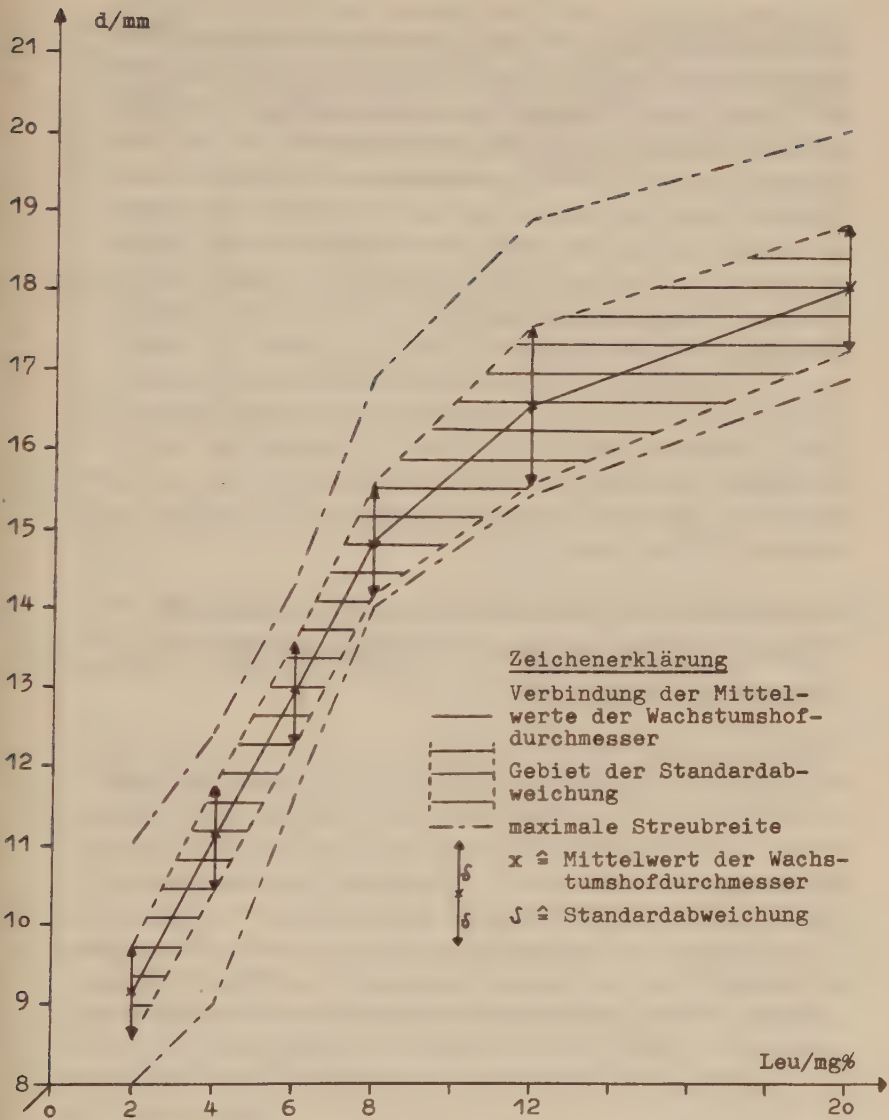


Abb. 4: Abhängigkeit des Wachstumshofdurchmessers d von der Leucinkonzentration (Leu) der Kontrollplättchen (Tabelle 14)

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß bei der Prüfung der Reproduzierbarkeit der Wachstumshöfe gleicher Kontrollplättchen und gleicher Blutproben auf gleichen und auf verschiedenen Testplatten eine erhebliche Differenz auftrat. Diese Unterschiede waren kleiner bei den Versuchen, bei denen gleiche Plättchen auf gleichen Testplatten lagen und größer bei den Versuchen, bei denen gleiche Plättchen auf verschiedenen Testplatten lagen. In Abb. 4 ist die Tabelle 14 graphisch dargestellt. Sie gibt die Meßgenauigkeit des Testes wieder. Die größte Genauigkeit liegt im Bereich von 2 - 8 mg%. Im Gebiet von 8 - 20 mg% sind die Standardabweichungen so groß, daß eine gute Trennung zwischen den einzelnen Werten nicht immer möglich ist und nicht in jedem Fall eine eindeutige Zuordnung der Wachstumshöfe unbekannter Blutproben zu den Wachstumshöfen der Kontrollplättchen vorgenommen werden kann.

D. Vergleichende Leucinbestimmung: mikrobiologisch im

GUTHRIE-Test und säulenchromatographisch nach MOORE,
SPACKMAN und STEIN (44)

Zwei Erwachsene wurden mit je 5 g und ein 2-jähriges Kind mit 1,5 g L-Leucin belastet. Die Blutproben, die 2 Stunden nach Belastung abgenommen worden waren, wurden sowohl säulenchromatographisch als auch mikrobiologisch im GUTHRIE-Test auf Leucin untersucht. Im GUTHRIE-Test wurden jeweils 3 Bestimmungen vorgenommen. Von den Werten, die zwischen zwei Kontrollwerten lagen, wurde das arithmetische Mittel aus beiden Grenzwerten als Wert der unbekannten Probe angenommen. Es ergaben sich folgende Resultate:

Versuchsperson Nr.	Leucinkonzentration säulenchromato- graphisch (mg%)	Leucinkonzentration mi- krobiologisch im GUTHRIE- Test (mg%) jeweils 3 Be- stimmungen	Mittelwert
1	3,78	6 4 - 6 4 - 6	5,3
2	3,58	6 - 8 4 - 6 4 - 6	5,7
3	5,80	12 6 - 8 8	9,0

Die Blutprobe eines 2-jährigen Kindes mit Verdacht auf Leucinose wurde ebenfalls säulenchromatographisch und mikrobiologisch auf ihren Leucingehalt untersucht:

Leucinkonzentration säulenchromato- graphisch (mg%)	Leucinkonzentration mikrobiolo- gisch im GUTHRIE-Test (mg%) 2 Bestimmungen	Mittelwert
8,43	8 - 12 8 - 12	10

Außerdem wurden 6 Phenylketonuriker, bei denen eine säulenchromatographische Aminosäurenbestimmung zur Kontrolle der Diät vorgenommen worden war, im Leucinose-test untersucht:

Patient Nr.	Leucinkonzentration säulenchromatographisch (mg%)	Leucinkonzentration mikrobiologisch im GUTHRIE-Test (mg%)
1	1,73	<2
2	1,22	<2
3	1,03	Wachstumshof nicht mehr deutlich meßbar
4	1,35	<2
5	2,99	2
6	1,92	2

Ergebnis der vergleichenden Leucinbestimmung:

Bei den Leucinbestimmungen niedriger Konzentrationen zeigte sich eine gute Übereinstimmung des GUTHRIE-Testes mit der säulenchromatographischen Methode. Bei den Leucinbestimmungen höherer Konzentration zeigte sich jedoch im GUTHRIE-Test ein erhebliches Abweichen der Werte nach oben, maximal um 3,2 mg%.

3. Technische Fehlermöglichkeiten

A. Verunreinigung der Testplatte

Im Gegensatz zum Galaktosämietest tritt eine Verunreinigung der Platte immer nur oberflächlich auf und kann daher nicht mit der Unsterilität des Agars und des Nährmediums in Zusammenhang gebracht werden. Sie wird wohl durch Keime hervorgerufen, die auf die Testplatte gelangen, während die Blutplättchen auf den Nährboden gelegt werden. Diese Verunreinigung tritt nur selten auf und erlaubt auch dann noch die Auswertung eines großen Teiles der Ergebnisse. Es empfiehlt sich jedoch ein schnelles, sauberes Arbeiten und eventuell das Tragen eines Mundschutzes.

B. Mehrmaliges Auftropfen eines Bluttropfens auf einen Fleck

Wie im Galaktosämietest zeigte sich auch im Leucinosetest bei Blutproben, bei denen mehrmals Blut auf einen Fleck getropft wurde, eine Vergrößerung der Höfe um etwa 1 - 2 mm gegenüber den Blutproben, bei denen nur ein- bis zweimal Blut aufgetropft wurde.

C. Alterung der benutzten Kontrollplättchen

Um die Haltbarkeit der Kontrollplättchen zu prüfen, wurden die Wachstumshöfe neu hergestellter Kontrollplättchen mit denen älterer Plättchen verglichen, die schon 8 Monate im Exsikkator bei 2 - 4 °C gelagert waren.

Tabelle 16: Wachstumshofdurchmesser der alten und neuen Kontrollplättchen auf der gleichen Testplatte

Leucinkonzentration der Kontrollplättchen (mg%)	Durchmesser der Wachstumshöfe (mm)	
	alte Kontrollplättchen	neue Kontrollplättchen
2	11,5	11,5
2	11,5	11,5
4	13,0	12,5
4	13,0	12,5
6	13,5	13,5
6	13,5	13,5
8	14,5	14,5
8	15,5	14,5
12	16,0	17,0
20	18,0	18,0

Wie auch im GUTHRIE-Test für Phenylketonurie (16) zeigte sich im Leucinosetest noch keine Verkleinerung der Wachstumszonen von 8 Monate alten Kontrollplättchen. Eine Fehlermöglichkeit durch Alterung der Kontrollen scheidet also zumindest in diesem Zeitraum aus. .

D. Zu lange Brutzeit

Eine Brutzeit über 20 Stunden läßt im Gegensatz zum Galaktosämietest die Höfe deutlich größer werden, erlaubt aber keine genaue Ausmessung der Wachstumszonen mehr, da ihre Begrenzung zu unscharf wird. Die optimale Brutzeit liegt zwischen 13 und 17 Stunden.

V. Resultate

1. Routinemäßige Untersuchung von Neugeborenen

Von den Testkarten, die täglich zur routinemäßigen Untersuchung auf Phenylketonurie kamen, wurden Blutproben von 3016 Neugeborenen zum größten Teil aus Hessen, Hannover und Bremen auf vermehrtes Leucin im Blut untersucht.

	Hessen	Hannover	Bremen	Aus anderen Städten bzw. Bundesländern
Zahl der Untersuch- ten	1609	732	623	52

Keines der untersuchten Kinder war jünger als 4 Tage, keines älter als 4 Wochen. Das Häufigkeitsmaximum lag bei einem Alter von 5 - 9 Tagen.

Von den 3016 untersuchten Blutproben zeigten 97 einen Leucinwert von 2 mg%, 13 einen Wert von 2 - 4 mg%, alle anderen Blutproben lagen unter 2 mg%. Von 44 Frühgeborenen zeigte keines einen Wert bei oder über 2 mg%. Bei 48 aller Untersuchten war auf der Testkarte "starker Ikterus" angegeben. Von 36 Reifgeborenen mit starkem Ikterus zeigten 5 (13,9 %) eine Leucinkonzentration von 2 mg%, von 2936 Reifgeborenen ohne starken Ikterus zeigten 92 (3,1 %) eine Leucinkonzentration von 2 mg%. Alle Frühgeborenen mit starkem Ikterus und alle Frühgeborenen

ohne starken Ikterus zeigten einen Leucinspiegel von weniger als 2 mg%. Eine eindeutige Konzentrationserhöhung von Leucin kann für Reifgeborene mit starkem Ikterus aus diesem sehr begrenzten Zahlenmaterial nicht gefolgert werden.

Tabelle 17a: Absolute Verteilung der Zahl der Untersuchten

	Zahl der Untersuchten	Zahl der Untersuchten mit einer Leucinkonzentration von:		
		< 2 mg%	2 mg%	2 - 4 mg%
1. Reifgeborene	2972	2862	97	13
2. Frühgeborene	44	44	0	0
1a. Reifgeborene mit starkem Ikt.	36	31	5	0
1b. Reifgeborene ohne starken Ikt.	2936	2831	92	13
2a. Frühgeborene mit starkem Ikt.	12	12	0	0
2b. Frühgeborene ohne starken Ikt.	32	32	0	0
Gesamtzahl der Untersuchten	3016	2906	97	13

Tabelle 17b: Prozentuale Verteilung der Untersuchten

	Zahl der Untersuchten	% der Untersuchten mit einer Leucinkonzentration von:		
		< 2 mg%	2 mg%	2 - 4 mg%
1. Reifgeborene	2972	96,3	3,3	0,4
2. Frühgeborene	44	100	0	0
1a. Reifgeborene mit starkem Ikt.	36	86,1	13,9	0
1b. Reifgeborene ohne starken Ikt.	2936	96,4	3,1	0,5
2a. Frühgeborene mit starkem Ikt.	12	100	0	0
2b. Frühgeborene ohne starken Ikt.	32	100	0	0
Gesamtheit der Untersuchten	3016	96,4	3,2	0,4

2. Untersuchung eines Patienten mit der "forme fruste" der Leucinose

Ein geistig und körperlich gesunder 2-jähriger Junge, Sohn gesunder Eltern und Bruder einer gesunden Schwester, wurde in die Marburger Kinderklinik mit dem Verdacht auf eine Leucinose eingeliefert.

Anamnestisch hatten sich seit einem Jahr mehrfach kurze psychomotorische Anfälle mit Gangabweichung gezeigt. Auffallend war ein zyklisch auftretender Harngeruch nach Maggi mit gleichzeitiger Ataxie und Ketonurie. Ein stark positiver Ausfall der Dinitrophenylhydrazonprobe verstärkte den Verdacht einer Leucinose. Die Intervalle waren völlig symptomfrei. Das Kind erschien jetzt zur ambulanten Untersuchung, da wieder der charakteristische Harngeruch bemerkt worden war. Bei der klinischen Untersuchung zeigten sich außer dem deutlichen Harngeruch keine pathologischen Befunde.

Eine Blutprobe dieses Kindes ergab im Leucinosetest einen Leucinwert von 8 - 12 mg%. Eine vorsichtige Belastung mit 1,5 g L-Leucin zeigte folgende Resultate:

B.B., 2 Jahre:

Zeit	Durchmesser der Wachstumshöfe (mm)	Annähernde Leucin-konzentration(mg%)
vor Belastung (B)	16,0	8 - 12
2 Std. nach B.	19,5	> 20
3 Std. nach B.	23,5	> 20.

Dazu die Kontrollplättchen auf der gleichen Testplatte:

Leucinkonzentration der Kontrollplättchen (mg%)	Durchmesser der Wachstumshöfe (mm)
2	8,0
2	9,5
4	10,5
4	10,5
6	12,5
6	12,5
8	14,5
12	17,0
20	18,5

Die Blutprobe eines 2-jährigen gesunden Vergleichskindes, das ebenfalls mit 1,5 g L-Leucin belastet wurde, ergab folgende Werte:

Zeit	Durchmesser der Wachstumshöfe (mm)	Annähernde Leucinkonzentration(mg%)
vor Belastung (B)	8	≤ 2
2 Std. nach B.	16	8 - 12
3 Std. nach B.	12	2 - 4

Die Kontrollplättchen auf der gleichen Testplatte zeigten folgende Durchmesser:

Leucinkonzentration der Kontrollplättchen (mg%)	Durchmesser der Wachstumshöfe (mm)
2	10,5
2	10,5
4	13,0

Leucinkonzentration der Kontrollplättchen (mg%)	Durchmesser der Wachstumshöfe (mm)
4	13,0
6	14,5
6	14,5
8	15,5
12	18,0
20	18,5

Die Blutprobe des Patienten zeigte 2 Stunden nach Belastung einen Leucinwert von über 20 mg%, 3 Stunden nach Belastung fand sich noch ein weiterer Anstieg der Leucinkonzentration (siehe auch Abb. 5, Seite 70). Die Blutprobe eines gesunden Vergleichskindes zeigte vor Belastung einen Leucinwert unter 2 mg%, der 2 Stunden nach Belastung auf eine Höhe von etwa 8 - 12 mg% anstieg und nach 3 Stunden wieder auf einen Wert von 2 - 4 mg% sank.

Eine säulenchromatographische Aminosäurenbestimmung bei dem nüchternen Patienten B.B. zeigte folgende Werte:

Leucin	8,4 mg%
Isoleucin	2,9 mg%
Valin	6,09 mg%
Alloisoleucin	1,38 mg%

Es fand sich also eine abnorme Vermehrung der verzweigt-kettigen Aminosäuren im Plasma, sowie auch das für die Leucinose charakteristische Auftreten des Alloisoleucins. Man kann wohl bei diesem Patienten eine "forme fruste" der Leucinose annehmen, wie sie ähnlich von MORRIS (45), LONSDALE (40) und KILL (33) beschrieben worden ist. Das periodische Auftreten der charakteristischen Erscheinungen nach längeren symptomfreien Intervallen weist darauf hin.

3. Leucinbelastungen bei Heterozygoten und normalen Vergleichspersonen

Die Eltern des oben beschriebenen Patienten wurden mit je 5 g L-Leucin belastet. Im Leucinosetest zeigten sich 2 und 3 Stunden nach Belastung folgende Werte:

Zeit	Leucinkonzentration der Blutproben (mg%)	
	Mutter B.	Vater B.
vor Belastung (B)	2	2
2 Std. nach B.	2	8
3 Std. nach B.	6 - 8	4 - 6

Vier normale Erwachsene wurden ebenfalls mit jeweils 5 g L-Leucin belastet. Sie zeigten im GUTHRIE-Test folgende Leucinkonzentrationen:

Zeit	Leucinkonzentration der Blutproben (mg%)			
	VP Nr.1	VP Nr.2	VP Nr.3	VP Nr.4 ¹⁾
vor Belastung (B)	2	2	2	2
2 Std. nach B.	4 - 6	6 - 8	4 - 6	4 - 6
3 Std. nach B.	2	4 - 6	4 - 6	4 - 6

Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigt bei Heterozygoten keine deutliche Erhöhung des Leucinblutspiegels gegenüber normalen Vergleichspersonen nach Belastung mit dieser Aminosäure (siehe auch Abb. 6, Seite 70).

1) VP = Vergleichsperson

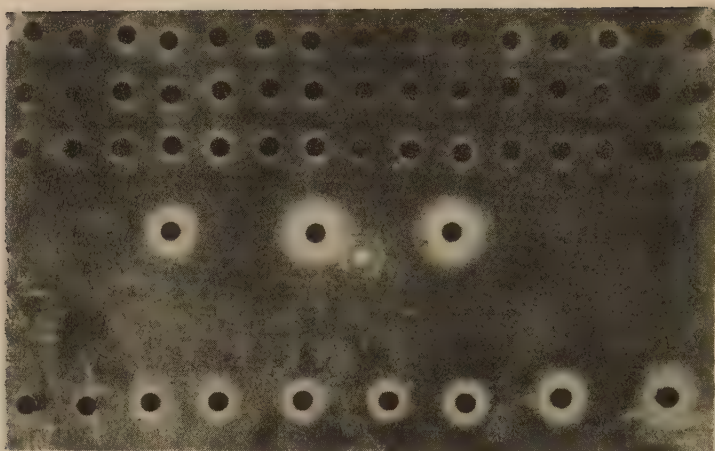


Abb. 5: Leucinbelastung bei einem Patienten und zum Vergleich drei Reihen mit Blutproben normaler Neugeborener. (Erklärung siehe Seite 71)

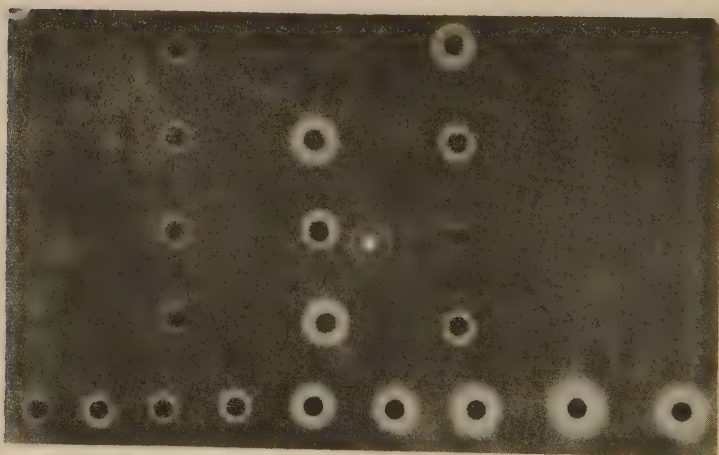


Abb. 6: Leucinbelastungen bei Heterozygoten und bei normalen Vergleichspersonen. (Erklärung siehe Seite 71)

Erklärung der Abbildungen 5 und 6 auf Seite 70

Abb. 5 zeigt die Testplatte mit den Blutproben des unbehandelten Patienten B.B. vor und nach Belastung mit 1,5 g L-Leucin. (Aufzählung jeweils von links nach rechts)

1., 2. und 3. Reihe: Wachstumshöfe von Blutproben normaler Neugeborener.

4. Reihe: Wachstumshöfe der Blutproben des Patienten B.B. vor Belastung und 2 und 3 Stunden nach Belastung.

Unterste Reihe: Wachstumshöfe der Kontrollplättchen aufsteigender Konzentration: 2 mg%, 2 mg%, 4 mg%, 4 mg%, 6 mg%, 6 mg%, 8 mg%, 12 mg% und 20 mg%.

Abb. 6 zeigt die Testplatte mit den Blutproben der Eltern des Patienten B.B. und den Blutproben zweier normaler Erwachsener vor und nach Belastung mit 5 g L-Leucin. (Aufzählung jeweils von links nach rechts)

1. Reihe: Wachstumshöfe der Blutproben der Mutter des Patienten vor Belastung und 2 und 3 Stunden nach Belastung.

2. Reihe: Wachstumshöfe der Blutproben des Vaters des Patienten vor Belastung und 2 und 3 Stunden nach Belastung.

3. und 4. Reihe: Jeweils die Wachstumshöfe der Blutproben zweier normaler Erwachsener vor Belastung und 2 und 3 Stunden nach Belastung.

Unterste Reihe: Wachstumshöfe der Kontrollplättchen: 2 mg%, 4 mg%, 2 mg%, 4 mg%, 6 mg%, 6 mg%, 8 mg%, 12 mg% und 20 mg%.

VI. Diskussion

Ein Nachteil des Leucinosetestes, der allerdings für die Suche nach Leucinocephalosepatienten ohne Gewicht ist, ist die Abnahme der Meßgenauigkeit bei Leucinbestimmungen höherer Konzentrationen (siehe Seite 60). Als Ursache solcher Meßfehler kann wohl die größere Streubreite der Ergebnisse einer mikrobiologischen Methode angesehen werden. Nicht zu erklären ist allerdings die in dieser Arbeit auftretende mangelnde Übereinstimmung der Ergebnisse der mikrobiologischen Methode mit denen der säulenchromatographischen Methode im Bereich von 3,5 mg% bis 8 mg%, besonders das gleichmäßige Abweichen der mikrobiologisch bestimmten Werte nach oben (siehe Seite 61). Eine größere Anzahl von Parallelbestimmungen wäre zur genaueren Abgrenzung dieser Diskrepanz notwendig.

In früheren Untersuchungen über den GUTHRIE-Phenylketonurietest, welcher ja auf einem dem Leucinosetest sehr ähnlichen Prinzip beruht, wurde ebenfalls die größte Meßgenauigkeit im Bereich der niederen Konzentrationen beobachtet (16).

Im Verlauf der in dieser Arbeit durchgeführten Massentestungen an Neugeborenen fand sich unter 3000 Untersuchungen kein "fraglich positiver Wert". Alle Leucinwerte lagen innerhalb des säulenchromatographisch bestimmten Normalbereiches ($(1,74 \pm 0,6)$ mg% bei SNYDERMAN (55), 0,58 mg% bis 2,03 mg% bei VIS (56), $(1,61 \pm 0,11)$ mg% bei LINNEWEH (36)). Diese einheitlich niedrigen Ergebnisse bei einer großen Zahl von Untersuchungen stellen eine gute Ausgangsposition zur Erkennung einer pathologischen Leucinerhöhung im Blut dar und erlauben die Anwendung des Leucinosetestes als Massentest. Wie im GUTHRIE-Test für Phenylketonurie (16) sollte ein Wert von 4 mg% im Blut als "vorläufig positiv" gelten und Grund für die Anforderung einer neuen Blutprobe darstellen.

In besonderem Maße stellt sich im Fall der Leucinose die Forderung nach einer äußerst frühzeitigen Diagnose. LINNEWEH weist auf die unterschiedlich schwere Verlaufsform dieser Krankheit hin, die es in ungünstigen Fällen unmöglich macht, selbst bei frühzeitig einsetzender Therapie einen Cerebralschaden ganz zu verhüten (38). Er beschreibt einen Patienten (38), bei dem trotz Therapiebeginns am 7. Lebenstag eine leichte geistige Retardierung zu verzeichnen war. SNYDERMAN berichtet dagegen über einen Fall, bei dem die Behandlung am 10. Lebenstag einsetzte, und der eine normale körperliche und geistige Entwicklung zeigte (55). WESTALL und Mitarb. (58) fanden bei einem Patienten am 4. Lebenstag papierchromatographisch eine abnorme Erhöhung der drei verzweigt-kettigen Aminosäuren im Plasma, die am 6. Lebenstag säulenchromatographisch mit einem Leucinwert von 52 mg% bestimmt wurde. Nach Einsetzen der Diät am 6. Tag erschien das Kind im Alter von 1 Jahr geistig und körperlich normal. WOODY und Mitarb. (59) wiesen dagegen schon am 3. Lebenstag eines Patienten einen abnorm erhöhten Leucinspiegel von 60 mg% nach.

Aus diesen Ausführungen ergibt sich für die Anwendung des Leucinosetestes als Massentest, wie wichtig eine frühzeitige Untersuchung im Hinblick auf die Prognose sein kann, wobei allerdings die Möglichkeit besteht, einen leichteren Fall, bei dem ein wirksamer Anstieg des Leucins im Blut zum Zeitpunkt der Untersuchung noch nicht erfolgt ist, zu übersehen ("falsch negatives Ergebnis"). Praktisch wird es kaum möglich sein, jeden schweren Fall der Leucinose im Verlauf einer Massentestung so rechtzeitig zu entdecken, daß durch eine frühzeitige Diät irreversible Cerebralschädigungen vermieden werden können, zumal Verzögerungen allein dadurch entstehen, daß die Blutproben erst mit der Post zu einer zentralen Untersuchungsstelle geschickt werden müssen, also nicht am Tag der Blutentnahme untersucht werden und ein Ergebnis ebenfalls erst am Tag nach der Untersuchung abgelesen werden kann.

Auch der GUTHRIE-Test für die Leucinose kann nach den vorliegenden Untersuchungsergebnissen nicht eindeutig als Heterozygotentest angewendet werden. Die Eltern eines kranken Kindes zeigten beide nach Leucinbelastung keine pathologische Toleranz gegenüber 4 Vergleichspersonen. LONSDALE und Mitarb. (40) belasteten 1963 die Elternpaare zweier kranker Kinder, ein gesundes Geschwisterkind sowie zwei Kontrollpersonen mit je 150 mg L-Leucin / kg Körpergewicht und fanden bei den Heterozygoten eine deutlich verminderte Toleranz gegenüber den Kontrollpersonen und dem Geschwisterkind. LINNEWEH und EHRLICH (37) führten bei 3 Elternpaaren kranker Kinder und bei 2 Kontrollpersonen Belastungen mit einem Aminosäurengemisch aus 10 g Isoleucin, 5 g Leucin und 5 g Valin durch. Sie fanden bei 5 von 6 Heterozygoten Alloisoleucin schon im Nüchternplasma. Nach Belastung zeigten alle Heterozygoten eine deutliche Vermehrung von Alloisoleucin. Kontrollpersonen zeigten weder im Nüchternplasma noch nach der Belastung Alloisoleucin. Deutlich erhöht war bei allen Heterozygoten nach Belastung Isoleucin, während sich kein Unterschied im Leucin- und Valingehalt des Plasmas gegenüber Normalpersonen zeigte.

Praktische Schlußfolgerung aus der Erprobung beider Teste

Der GUTHRIE-Test für die Galaktosämie und der GUTHRIE-Test für die Leucinose sind zur Anwendung als Massenteste gut geeignet. Die einheitlich niedrigen Ergebnisse von mehreren tausend Untersuchungen bilden eine Grundlage zur Erkennung eines positiven Falles. Der Galaktosämietest ist nicht spezifisch. Valin und Glycin hemmen wie Galaktose das Wachstum der Coli-Mutante, so daß bei Verdacht auf einen positiven Galaktosämiefall erst eine Identifizierung der hemmenden Substanz vorgenommen werden muß, um eine pathologische Glycin- oder Valinerhöhung im Blut auszuschließen. Der Leucinosetest ist von größerer Spezifität als der Galaktosämietest und noch einfacher und sicherer zu handhaben, da er eine unsterile Arbeitsweise zuläßt und es außerdem erlaubt, für den jeweiligen Versuch eine fertige Sporenaufschwemmung zu benutzen. Sein Nachteil ist wie beim Galaktosämietest die geringere Meßgenauigkeit in höheren Konzentrationsbereichen.

Abschließend sei noch darauf hingewiesen, daß gerade bei Nebeneinanderlaufen zweier oder mehrerer GUTHRIE-Testprogramme die Rentabilität der Methode erheblich steigt, da das gemeinsame Prinzip der Teste es möglich macht, in einem Arbeitsgang gleichzeitig den Anforderungen mehrerer Teste zu genügen. Werden alle drei GUTHRIE-Teste (für Phenylketonurie, Leucinose und Galaktosämie) eingeführt, so empfiehlt sich eine gemeinsame Eisessigdampfbehandlung aller Blutproben.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Zwei neue mikrobiologische Hemmteste von ROBERT GUTHRIE zur Erkennung der Galaktosämie und der Leucinose wurden in dieser Arbeit auf ihre Eignung als Massenteste untersucht und kritisch besprochen. Das Prinzip des Galaktosämietestes besteht in der Hemmung des Wachstums einer uridyltransferase-freien Mutante von *Escherichia coli* durch D-Galaktose auf einem bestimmten Nährboden. Beim Leucinostest wird die Hemmung des Wachstums einer bestimmten *Bacillus-subtilis*-art durch DL-2-Methyllleucin auf einem Minimalnährboden durch L-Leucin verhindert.

Zur routinemäßigen Testung von Neugeborenen wird durch Hackenstich ein Tropfen Blut gewonnen und auf Filterpapier getropft. Aus dem Blutfleck wird mit einem gewöhnlichen Papierlocher ein Plättchen ausgestanzt und auf den mit *Escherichia coli* bzw. *Bacillus subtilis* inokulierten und mit DL-2-Methyllleucin versetzten Nährboden gelegt. Beim Galaktosämietest entstehen um diese Blutplättchen nach Bebrütung Hemmhöfe, beim Leucinostest Wachstumshöfe. Diese werden verglichen mit den Hemm- bzw. Wachstumshöfen von Kontrollblutplättchen, die jeweils mit Blut verschiedener Galaktose- bzw. Leucinkonzentration getränkt und auf den gleichen Nährboden gelegt wurden.

Bei der Einarbeitung der Teste zeigte sich, daß eine Person täglich leicht 200 - 300 Blutproben auf Galaktosämie oder Leucinose untersuchen kann. Spezifitätsuntersuchungen erfaßten den Einfluß von Antibiotika und Sulfonamiden sowie anderer physiologischer Substanzen im Blut. Während sich der Leucinostest weitgehend spezifisch erwies, zeigte sich im Galaktosämietest neben Galaktose ebenfalls ein Einfluß der Aminosäuren Valin und Glycin. Reproduzierbarkeit und Meßgenauigkeit beider Teste wurden geprüft. Bei vergleichen-den Galaktosebestimmungen, wobei Galaktose mikrobiologisch im GUTHRIE-Test und als Differenz von Gesamtreduktion und "wahrer Glukose" bestimmt wurde, ergab sich eine relativ

gute Übereinstimmung der gefundenen Werte. Vergleichende Leucinbestimmungen - mikrobiologisch im GUTHRIE-Test und säulenchromatographisch - zeigten eine gute Übereinstimmung bei den Leucinbestimmungen niedriger Konzentrationen, jedoch ein erhebliches Abweichen der im GUTHRIE-Test gefundenen Werte nach oben bei den Bestimmungen höherer Konzentrationen.

An 40 Neugeborenen wurden Galaktosebelastungsteste durchgeführt, wobei eine große Schwankungsbreite der Ergebnisse auffiel. An 2 Patienten mit manifester Galaktosämie wurden Galaktosebelastungen und an einem Patienten mit der "forme fruste" der Leucinose wurde eine Leucinbelastung durchgeführt und die Ergebnisse mit Belastungen an gesunden Kindern verglichen. Galaktose- und Leucinbelastungen an Heterozygoten und normalen Kontrollpersonen zeigten, daß eine scharfe Abgrenzung beider Gruppen nicht möglich war.

Die Ergebnisse von Untersuchungen von über 8000 Neugeborenen wurden wiedergegeben. Dabei zeigte sich, daß die einheitlich niedrigen gefundenen Werte eine gute Grundlage zur Auffindung eines positiven Falles darstellen. Neben dieser Tatsache läßt auch die Rentabilität der Methode, die beim Nebeneinanderlaufen zweier oder mehrerer Testprogramme weiter zunimmt, beide Tests zur Anwendung als Massenteste geeignet erscheinen.

Literaturverzeichnis

1. ANDERSON, E.P., H.M. KALCKAR, K. KURAHASHI, and K.J. ISSELBACHER: A specific enzymatic assay for the diagnosis of congenital galactosemia. I. The consumption test.
J. Lab. Clin. Med. 50, 469 (1957).
2. BARTHELMAI, W., R. CZOK: Enzymatische Bestimmung der Glukose im Blut, Liquor und Harn.
Klin. Wschr. 40, 11, 585 (1962).
3. BENEDICT, S.R.: The analysis of whole blood. II. The determination of sugar and of saccharoids (nonfermentable copper-reducing substances).
J. Biol. Chem. 92, 141 (1931).
4. BERRY, H.K., C. SCHEEL, and J. MARKS: Microbiological test for leucine, valine and isoleucine using urine sample dried on a filterpaper.
Clinical Chemistry Vol. 8, Nr. 3 (1962).
5. BEUTLER, E., M. BALUDA, and G.N. DONNELL: A new method for the detection of galactosemia and its carrier state.
J. Lab. Clin. Med. 64, 4, 694 - 705 (1964).
6. BICKEL, H., and E.M. HICKMANS: Paper chromatographic investigations on the urine of patients R.T. and R.R..
Arch. Dis. Childh. 27, 348 (1952).
7. BICKEL, H. und F. SOUCHON: Die Papierchromatographie in der Kinderheilkunde.
31. Beiheft zum Archiv für Kinderheilkunde (1959).
8. BRETHAUER, R.K., R.C. HANSEN, G. DONNELL, and W.R. BERGREN: A procedure for detecting carriers of galactosemia.
Proc. Nat. Acad. Sc. 45, 328 (1959).
9. CONSDEN, R., A.H. GORDON, and A.J.P. MARTÍN: Qualitative

- analysis of proteins: a partition chromatographic method using paper.
Biochem. J. 38, 224 (1944).
10. DANCIS, J., M. LEVITZ, S. MILLER, and R.G. WESTALL: Maple syrup urine disease.
Brit. Med. J. 1, 31 (1959).
11. DANCIS, J., J. HUTZLER, and M. LEVITZ: The diagnosis of maple syrup urine disease (branched-chain keto-aciduria) by the in vitro study of the peripheral leukocyte.
Pediatrics 32, 234 (1963).
12. DENT, C.E., and R.G. WESTALL: Studies in maple syrup disease.
Arch. Dis. Childh. 36, 259 (1961).
13. DONNELL, G.N., W.R. BERGREN, and M. ROLDAN: Genetic studies in galactosemia: The oral galactose tolerance test and the heterozygous state.
Pediatrics 24, 418 (1959).
14. DONNELL, G.N., W.R. BERGREN, G. PERRY, and R. KOCH: Galactose-1-phosphate in galactosemia.
Pediatrics 31, 5 (1963).
15. DORMANDY, T.L., D. LEAK, and M. GRANT: Hyperglycaemia induced by galactose.
Lancet 2, 269 (1959).
16. v. EICKEN, W.D.: Der Guthrie-Test, eine Methode zur Phenylalaninbestimmung im Blut. Seine Verwendung zur Früherfassung der Phenylketonurie und zu ihrer diätetischen Einstellung.
Dissertation, Marburg/Lahn (1966).
17. FOLIN, O., and H. WU: A system of blood analysis: A simplified and improved method for determination of sugar.
J. Biol. Chem. 41, 367 (1920).

18. GINSBURG, V., and E.F. NEUFELD: The inhibition of phosphoglucumutase by galactose-1-phosphate.
Abstr., Meeting of Am. Chem. Soc., Sept. 1957
19. GUTHRIE, R., and A. SUSI: A simple blood phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants.
Pediatrics 32, 338 (1963).
20. GUTHRIE, R., O. KRAJNYAK, S. KUHN, P. PEPE, and A. SUSI: An "inhibition assay" for detection of maple syrup urine disease in the newborn infant.
Noch nicht veröffentlicht.
21. GUTHRIE, R.: AGAR-diffusion assay for galactose, using a galactose-sensitive mutant of Escherichia coli.
Noch nicht veröffentlicht.
22. GUTHRIE, R., and S. WHITNEY: Nationwide screening program for phenylketonuria by the "inhibition assay" technic.
American Public Health Association 91st annual meeting, Kansas City Missouri, November 12, 1963.
Nicht veröffentlicht.
23. GUTHRIE, R.: Routine screening for inborn errors in the newborn: "Inhibition assays", "instant bacteria", and multiple tests.
International Copenhagen Congress on the Scientific Study of Mental Retardation, August 11, 1964.
24. GUTHRIE, R.: Briefliche Mitteilung an Professor Dr. Bickel vom 29. 10. 1964.
25. GUTHRIE, R.: Briefliche Mitteilung an Professor Dr. Bickel vom 3. 11. 1964.
26. GUTHRIE, R.: Vortrag in der Universitätskinderklinik Marburg/Lahn vom 25. 10. 1965.

27. HAGEDORN, H.C. und B.N. JENSEN: Zur Mikrobestimmung des Blutzuckers mittels Ferricyanid.
Biochem. Z. 135, 46 (1923).
28. HANSEN, R.G., R.K. BRETHAUER, J. MARKS, and J.H. NORDIN: Estimation of the frequency of occurrence of galactosemia in the population.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 115, 560 - 563 (1964).
29. HARTMANN, A.F., E. GRUNWALDT, and D.H. JAMES: Blood galactose in infants and children.
J. Pediat. 43, 1 (1953).
30. HOLZEL, A., and G.M. KOMROWER: A study of the genetics of galactosemia.
Arch. Dis. Childh. 30, 155 (1955).
31. HSIA, D.Y.V., M. TANNENBAUM, J.A. SCHNEIDER, J. HUANG, and K. SIMPSON: Further studies on the heterozygous carrier in galactosemia.
J. Lab. Clin. Med. 56, 368 (1960).
32. KALOKAR, H.M., E.P. ANDERSON, and K.J. ISSELBACHER: Galactosemia, a congenital defect in a nucleotid transferase.
Biochem. Biophys. Acta 20, 262 (1956).
33. KILL, R., and T. KOKKONES: Late manifesting variant of branched-chain ketoaciduria (maple syrup urine disease).
Acta paediat. 53, 356 (1964).
34. KIRKMAN, H.N., and E. BYNUM: Encymic evidence of a galactosemic trait in parents of galactosemic children.
Ann. Human Genet. 23, 117 (1959).
35. LERMAN, S.: Pathogenetic factors in experimental galactose cataract.
A. M. A. Arch. Ophtal. 63, 128 (1960).

36. LINNEWEH, F.: Erbliche Stoffwechselkrankheiten.
München und Berlin: Urban und Schwarzenberg S.141 (1963).
37. LINNEWEH, F. und M. EHRLICH: Heterozygoten-Test für
die Ahornsirupkrankheit.
Klin. Wschr. 41, 255 (1963).
38. LINNEWEH, F. und U. WILLENBOCKEL: Zur diätetischen
Therapie der Ahornsirupkrankheit (Leucinose).
Monatsschrift für Kinderheilkunde 113, 6, 420 (1965).
39. LONDON, M., H.J. MARYMONT, and J. FULD: A micro-
diffusion test for congenital galactosemia utilizing
galactose-1-C¹⁴.
Pediatrics 33, 3 (1964).
40. LONSDALE, D., R.D. MERCER, and W.R. FAULKNER: Maple
syrup urine disease.
Amer. J. Dis. Child. 106, 258 (1963).
41. MACKENZIE, D.Y., and L.J. WOOLF: Maple syrup urine
disease, an inborn error in the metabolism of valine,
leucine, and isoleucine, associated with gross mental
deficiency.
Brit. Med. J. 1, 90 (1959).
42. MENKES, J.H., P.L. HURST, and J.M. CRAIG: A new syn-
drome: progressive familial infantile cerebral dys-
function associated with an unusual urinary substance.
Pediatrics 14, 462 (1954).
43. MENKES, J.H.: Maple syrup urine disease; isolation
and identification of organic acids in the urine.
Pediatrics 23, 348 (1959).
44. MOORE, S., D.H. SPACKMAN, and W.H. STEIN: Chromato-
graphy of amino acids on sulfonated polystyrene re-
sins. An improved system.
Analyt. Chem. 30, 1185 (1958).

45. MORRIS, M.D., B.D. LEWIS, P.D. DOOLAN, and H.A. HARPER: Clinical and biochemical observations on an apparently nonfatal variant of branched-chain ketoaciduria (maple syrup urine disease).
Pediatrics 28, 918 (1961).
46. MÜLLER, D.: Studien über ein neues Enzym Glukose-oxydase I.
Biochem. Z. 199, 136 (1928).
47. SCHREIER, K.: Die angeborenen Stoffwechselanomalien.
Stuttgart 1963.
48. SCHWARZ, V., L. GOLBERG, G.M. KOMROWER, and A. HOLZEL: Some disturbances of erythrocytic metabolism in galactosemia.
Biochem. J. 62, 34 (1956).
49. SCHWARZ, V., A. HOLZEL, and G.M. KOMROWER: Laboratory diagnosis of congenital galactosemia at birth.
Lancet 1, 24 (1958).
50. SCHWARZ, V.: A simplified diagnostic test for galactosemia.
J. Lab. Clin. Med. 56, 3 (1960).
51. SELIGSON, D., J.R. TORGHELE, and J.A. ANDERSON: An improved method for the determination of amino acids in small samples of blood and urine.
J. Lab. Clin. Med. 35, 640 (1950).
52. SHAFFER, P.A., and A.F. HARTMANN: The iodometric determination of copper and its use in sugar analysis.
J. Biol. Chem. 45, 349 (1920/21).
53. SIDBURY, J.B.: The enzymatic lesions in galactosemia.
J. Clin. Invest. 36, 929 (1957).
54. SOMOGYI, M.: A method for the preparation of blood filtrates for the determination of sugar.
J. Biol. Chem. 86, 655 (1930).

55. SNYDERMAN, S.E., P.M. NORTON, E. ROITMAN, and L.E. HOLT: Maple syrup urine disease with particular reference to dietotherapy.
Pediatrics 34, 4 (1964).
56. VIS, H.L.: Aspects et mécanismes des hyperaminoaciduries de l'enfance.
Editions Arscia S.A. Bruxelles, Libraire maloine S.A. Paris, 1963.
57. WADA, Y., K. TADA, A.A. MINAGANA, T. YOSHIDA, T. MORIKAMURA, and T. OKAMURA: Idiopathic hypervalinemia. Probably a new entity of inborn error of valine metabolism.
Tohoku, J. exp. Med. 81, 46 (1963).
58. WESTALL, R.G.: Dietary treatment of a child with maple syrup urine disease (branched-chain ketoaciduria).
Arch. Dis. Childh. 38, 465 (1963).
59. WOODY, N.C., H.B. WOODY, and Th.D. TILDEN: Maple syrup urine disease in negro infant.
Amer. J. Dis. Child. 105, 381 - 386 (1963).
60. WOOLF, L.J.: Maple syrup urine disease.
Zitiert nach F. Linneweh: Erbliche Stoffwechselkrankheiten, München und Berlin 1962, Art. 19.

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. Linneweh, Direktor der Universitätskinderklinik in Marburg, an dessen Klinik ich arbeiten durfte. Herzlich gedankt sei auch Herrn Professor Dr. Bickel für die Überlassung des Themas dieser Arbeit sowie für seine stets hilfreiche Beratung bei der Durchführung der Versuche. Herrn Dr. Mannheim vom Hygiene-Institut in Marburg (Direktor: Herr Professor Dr. Siegert) danke ich für seine Hilfe bei der Züchtung der Bakterien. Danken möchte ich auch der medizinisch - technischen Assistentin Frau Böttcher, die mir wesentlich bei der Einarbeitung des Testes behilflich war.

Lebenslauf

Ich, Heide Groß, wurde am 12. 5. 1941 in Bunzlau in Schlesien als Tochter des Arztes Dr. Walter Groß und seiner Ehefrau Irmgard geboren. 1945 flüchteten wir auf die Insel Pellworn. Hier wurde ich 1947 eingeschult. 1948 zog unsere Familie nach Wiesbaden. Von 1951 bis 1960 besuchte ich dort die Helene-Lange-Schule, wo ich am 3. März 1960 die Reifeprüfung bestand. Vom Sommer-Semester 1960 bis zum Sommer-Semester 1962 besuchte ich die Johannes Gutenberg-Universität in Mainz, wo ich 1962 die Ärztliche Vorprüfung ablegte. Im Winter-Semester 1962/63 und im Sommer-Semester 1963 studierte ich an der Georg-August-Universität in Göttingen. Im Winter-Semester 1963/64 wechselte ich an die Philipps-Universität Marburg über. Hier bestand ich am 19. September 1966 die Ärztliche Prüfung.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

in Mainz: Dabelow, Höhn, Kern, Klages, Lang, Laven, Mislin, Schriever, Straßmann, Watzka;

in Göttingen: Brandis, Bushe, Doering, Hellner, Hort, Kirchhoff, Konsc, Kräubig, Lendle, Linzbach, Schoen, Schweer, Südhof, Witt;

in Marburg: Beckmann, Berendes, Bickel, Bommer, Braun-Falco, Buchholz, Dölle, Exner, Gedigk, Hamm, Herrmann, Hildebrandt, Jacob, Korb, Lang, Linneweh, Martini, Marx, du Mesnil de Rochemont, Petzoldt, Rodeck, Rohen, Salfeld, Schiff, Schleyer, Schmid, Schrappe, Schwaiger, Siegert, Siess, Straub, Streicher, Würterle.

